



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

**Formación de biopelículas, viabilidad y filamentación de aislados clínicos de
Candida albicans en presencia de *Streptococcus sanguinis***

Diego Nicolás Pacheco Ahumada

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL
Dra. Carla Lozano Moraga

TUTORA ASOCIADA
Dra. Claudia Lefimil Puente

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08

Santiago - Chile

2021



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

**Formación de biopelículas, viabilidad y filamentación de aislados clínicos de
Candida albicans en presencia de *Streptococcus sanguinis***

Diego Nicolás Pacheco Ahumada

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Carla Lozano Moraga

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Claudia Lefimil Puente

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08

Santiago - Chile

2021

Dedicatorias

Dedico este trabajo de investigación a mi completa familia que siempre estuvo detrás de cada paso que di, incluyendo a quienes no están presentes hoy en día. Además de amigos muy cercanos que me apoyaron y me animaron, junto con mis compañeros de clases y futuros colegas.

Agradecimientos

A mi familia en general, agradezco todo el esfuerzo que hicieron para que pueda estudiar, salir de mi ciudad natal y costear durante muchos años todo gasto necesario para seguir adelante y lograr ser un profesional, además de ser un fuerte soporte emocional durante todos los años.

A mis padres, por toda su preocupación, cariño, educación y perseverancia que mostraron en mí, durante todo el proceso académico y que me permitió llegar a donde estoy.

A mi hermano Fernando por todo su esfuerzo y dedicación que uso para que emprenda esta carrera y nunca me rindiera.

A mis amigos, que lograban siempre animarme y distraerme cuando fue necesario, además de ser una fuente constante de ánimo.

A mi tutora, le agradezco eternamente la paciencia que tuvo conmigo y por sobre todo su gran dedicación, junto con un excelente trabajo que contribuyo notablemente en la realización de esta tesis y que me guío y ayudó en todo el proceso.

Y finalmente, gracias a la Universidad de Chile por brindarme esta formación profesional de excelencia.

Índice

	Página (s)
Resumen.....	1
Marco teórico.....	2
Hipótesis y Objetivos.....	14
Metodología.....	15
Resultados.....	20
Discusión.....	32
Conclusiones.....	43
Referencias bibliográficas.....	44
Anexos y apéndices.....	50

1. RESUMEN

Introducción: La caries dental es un proceso multifactorial, dominado por una biopelícula en la que participan bacterias y algunos hongos. El conocimiento de la interacción de estos microorganismos además de otros factores resulta relevante para entender como la biopelícula se torna patológica y conduce al desarrollo de caries. *Candida albicans* es una levadura que habita en la cavidad bucal como comensal y también participa en la conformación de biopelículas. *Streptococcus sanguinis* es una bacteria comensal y que predomina en estados de salud oral. El objetivo del estudio es determinar la capacidad de formar biopelículas, filamentación y viabilidad de aislados clínicos orales de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis*, y el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la levadura.

Metodología: En los ensayos de formación de biopelículas se utilizó saliva (o ausencia de ésta) proveniente de individuos libres de caries o con historia de caries o con lesiones de caries activas. Se inoculó cada condición experimental con aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis* o *S. mutans*. Se cuantificó la formación de biopelículas y recuento de células viables de la levadura. Además, se determinó la filamentación de la levadura en cultivos mixtos con bacterias y el efecto del H₂O₂ en la viabilidad de ésta.

Resultados: Los aislados clínicos de *C. albicans* presentaron mayor formación de biopelículas en presencia de las bacterias estudiadas en todas las condiciones experimentales respecto a los monocultivos, y con leves diferencias según el origen de la saliva y bacteria. El recuento de células viables tiende a disminuir en biopelículas mixtas respecto al monocultivo de las levaduras en todas las condiciones experimentales. La filamentación de *C. albicans* fue mayor al estar en cultivo mixto, principalmente el aislado P1-1 en presencia de *S. mutans* ($p < 0,05$), respecto a las otras condiciones. El H₂O₂ inhibió la viabilidad de los aislados clínicos a concentraciones mayores a 0,005 mM.

Conclusiones: El origen tanto de los aislados clínicos de *C. albicans*, las bacterias, así como las salivas utilizadas, podrían estar implicadas en modular el desarrollo de la formación de biopelículas mixtas, consecuentemente con efectos en el crecimiento y filamentación de la levadura.

2. MARCO TEÓRICO

Microbioma oral

El estudio del microbioma oral, en las últimas décadas, ha logrado identificar a cientos de microorganismos participantes, provenientes de distintos orígenes tanto procariontes como eucariontes, y se ha concluido que posee una alta diversidad, conteniendo bacterias, arqueas, hongos, protozoos e incluso virus. En el caso de las bacterias, se ha descrito que son las principales responsables de los estados patológicos de la cavidad oral, en enfermedades tales como la caries dental y la periodontitis (Wade y cols., 2012).

Estas enfermedades orales son las de mayor prevalencia en el mundo (Kassebaum y cols., 2015). Bajo condiciones de salud oral, la placa dental o biopelícula (*biofilms*) juega un papel esencial en los mecanismos de defensa naturales del hospedero; sin embargo, ésta también es el agente etiológico asociado tanto con la caries dental como con la periodontitis. Las bacterias de la placa dental con frecuencia se enfrentan a factores que desafían un estado compatible con la salud, entre los cuales se incluyen: la exposición a alimentos con alto contenido de azúcares fermentables, una ineficiente o insuficientes prácticas de higiene oral, procesos de envejecimiento, factores genéticos, cambios inmunes en el hospedero y hasta la exposición al humo del tabaco. Todos estos factores pueden afectar el microambiente oral generando condiciones que fomenten que algunos integrantes de la microbiota comensal, asociada a salud oral, cambien a un estado patogénico asociado a enfermedad (Pitts y cols., 2017).

Saliva

La saliva juega un papel importante en la determinación de la composición y la actividad del microbiota oral, a través de una variedad de mecanismos. Las moléculas provenientes principalmente de la saliva forman una película acondicionadora sobre el esmalte dental, la película salival adquirida (PSA), proporcionando así receptores para la unión microbiana (Prabhakar y cols., 2009).

Se ha descrito que algunas proteínas salivales tales como la peroxidasa, lisozima, lactoferrina e histatina se encuentran en la PSA, lo cual permite que algunas bacterias como aquellas colonizadoras tempranas de la biopelícula se adhieran, iniciando de esta manera la formación de esta estructura. Además, la biopelícula dental proporciona una actividad protectora contra la enfermedad de caries, ya que puede interferir con el metabolismo del azúcar fermentable sacarosa y por otro lado promover la agregación microbiana con una posterior eliminación de bacterias cariogénicas (Zhu y cols., 2018). También se ha propuesto que las proteínas ricas en prolina y la Inmunoglobulina A (IgA) salival pueden participar en la opsonización (marcar a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito) y en el deterioro de la adherencia bacteriana a la superficie del diente en individuos libres de caries (revisado en Castro y cols., 2016).

La saliva también amortigua el pH en la biopelícula alrededor de la neutralidad, creando un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos orales que proporcionan beneficios importantes para el hospedero. Las células microbianas adheridas a la superficie de los dientes pueden usar algunos componentes de la saliva, como las glicoproteínas, como su principal fuente de nutrientes para el crecimiento. Para esto, las bacterias orales funcionan de manera concertada para catabolizar estas moléculas que son complejas en estructura. Cabe destacar además que en la saliva también están presentes los componentes de las defensas adaptativas e innatas del hospedero, y estos a menudo funcionan sinérgicamente y en concentraciones subletales, por lo que se desarrolla una relación compleja entre el hospedero y la microbiota residente (Marsh y cols., 2015).

Son escasas las investigaciones sobre la composición proteica y enzimática de la saliva de las personas en estudios microbiológicos y sus resultados aún no son concluyentes, aunque algunos estudios han informado una diferencia en la concentración total de proteínas salivales entre individuos con diferente experiencia de caries, las metodologías utilizadas son heterogéneas y los resultados no son fácilmente comparables entre ellos. Pero, cabe destacar que se han descrito diferencias en la cantidad de especies bacterianas presentes en saliva no

estimulada de hasta tres veces mayor en comparación a saliva estimulada (Gomar-Vercher y cols., 2018).

Disbiosis oral y patobiontes

Cuando cambia el entorno oral, la ecología del microambiente es afectada. Esto tiene un impacto en el resultado de las interacciones entre los microorganismos en las biopelículas, lo que afectará las proporciones de los integrantes de la comunidad, y puede aumentar el riesgo de una enfermedad oral (Marsh y Zaura, 2017). Si ciertas presiones ambientales clave superan los umbrales, que varían de un paciente a otro, entonces se altera la homeostasis de la biopelícula, lo que permitirá que se produzca la disbiosis, lo que podría desencadenar en el inicio o desarrollo de una lesión de caries. Además, un proceso disbiótico puede ocurrir también rápidamente si se altera el flujo salival.

Por otro lado, la presencia de patógenos asociados a enfermedades orales polimicrobianas, en bajos niveles en condiciones de salud oral, sugiere que éstas no se pueden considerar de naturaleza infecciosa y que los agentes microbianos causantes se describen mejor como patobiontes. Por lo tanto, estos microorganismos son bacterias residentes (como comensales) con el potencial de causar enfermedades, pero que, en condiciones equilibradas, el sistema inmune no tiene una respuesta activa contra ellas (Simón-Soro y Mira, 2014).

Con relación a lo anterior, los cambios en el tipo de los nutrientes en la superficie dental, debido al aumento de los carbohidratos fermentables (con las condiciones ácidas resultantes) y las proteínas del hospedero, interrumpen las interacciones biológicas que controlan el equilibrio de las comunidades microbianas en salud, produciendo una disbiosis y un consecuente inicio de una lesión de caries.

El inicio y progresión de una lesión de caries dental se asocia a una biopelícula microbiana y a una mayor frecuencia de ingesta de azúcar en la dieta. Estos azúcares se metabolizan rápidamente a ácido (principalmente ácido láctico)

y se genera un pH bajo dentro de la biopelícula (Pitts y cols., 2017). El lactato puede ser usado por *Veillonella* spp. y otras especies bacterianas del género *Neisseria*, *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Porphyromonas* y *Actinomyces*, las cuales pueden convertirlo a ácidos más débiles. Lo anterior se observó en cultivos bacterianos obtenidos de ratas inoculadas con *Streptococcus mutans* y *V. alcalescens*, donde se determinó que cuando estas bacterias crecieron juntas, hubo una menor cantidad de lactato y menos lesiones de caries que en ratas inoculadas sólo con *S. mutans* (Becker y van der Hoeven, 1984).

Las condiciones frecuentes de pH bajo en las biopelículas asociadas con las lesiones de caries, inhiben el crecimiento de aquellas bacterias asociadas con la salud del esmalte, lo que resulta en una disminución de la diversidad microbiana (Gross y cols., 2012). Estas condiciones también alteran la competitividad de la comunidad de las biopelículas y seleccionan mayores proporciones de bacterias acidogénicas y tolerantes al ácido, incluidas las del grupo mutans streptococci y grupo lactobacilli. La disbiosis inducida por exceso de azúcar (principalmente sacarosa) resulta no solo en una reducida diversidad taxonómica, sino también en un metaproteoma modificado, como se demostró recientemente en modelos de microcosmos donde las proteínas involucradas en la tolerancia y producción de ácido dominaron las biopelículas disbióticas (Rudney y cols., 2015).

Un mecanismo antagónico frente a la acidificación del microambiente oral es la producción de compuestos alcalinos por parte de algunos comensales integrantes de la comunidad bacteriana, principalmente a través de la producción de amoníaco o amonio a partir de arginina y urea, lo cual eleva el pH (Takahashi, 2015). Por lo tanto, a diferencia de la salud oral, la caries dental se asocia con un cambio en la composición de la biopelícula a una comunidad que está dominada por una microbiota fuertemente sacarolítica y tolerante al ácido que conduce a una pérdida de diversidad y una reducción en los niveles y actividad de las bacterias beneficiosas (Marsh y Zaura, 2017).

Debido a lo expuesto anteriormente, la prevención efectiva de la enfermedad de caries, por lo tanto, requerirá que se interfiera con estos factores que impulsan la disbiosis (Marsh, 2003), y una mayor comprensión de las interacciones microbianas podría conducir a estrategias para promover activamente la salud oral.

Interacciones microbiológicas

La colonización de la mucosa oral y las superficies de los tejidos dentales duros por microorganismos está acompañada por un intercambio dinámico de información intra e interespecies entre comunidades microbianas diversas, así como la comunicación entre microorganismos y el hospedero. El resultado ideal de la colonización microbiana es crear un entorno protector caracterizado por un consorcio de comensales y varias especies colonizadoras. La protección ofrecida por los comensales residentes se puede ver tanto temporal como espacialmente: temporalmente, desde la colonización inicial, después del nacimiento, puede contribuir a una función adecuada del sistema inmune del hospedero, y por otro lado, espacialmente, ya que las interacciones comunitarias entre las especies y las interacciones especies-hospedero producen principalmente efectos locales. Para recibir estos beneficios protectores de los microorganismos, es crítico mantener la simbiosis microbiana. Existen varios mecanismos conocidos que promueven una relación simbiótica con el microbioma, por ejemplo, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por bacterias comensales del género *Streptococcus* (revisado en Redanz y cols., 2018). Sin embargo, es necesario estudiar las interacciones microbiológicas para determinar si es factible intervenir allí y así disminuir la formación de biopelículas y posteriormente la caries dental.

Interacciones bacteria - bacteria

Como ya se mencionó anteriormente, existen interacciones microbianas sinérgicas o antagónicas entre los integrantes que forman parte de las biopelículas dentales. Una de las que se destaca y que ha sido ampliamente estudiada y reportada es aquella interacción entre *S. sanguinis* y *S. mutans* (Giacaman y cols.,

2015; Lozano y cols., 2019). Además, se ha descrito que los niveles relativos de estas bacterias en la cavidad oral varían según el estado de salud oral, esto es, recuentos de *S. sanguinis* son mayores en salud oral y recuentos de *S. mutans* son mayores en condiciones cariogénicas (Ge y cols., 2008).

El estudio de Redanz y cols. (2020) demostró que la bacteria asociada a salud oral, *S. parasanguinis*, una especie del género *Streptococcus* del grupo mitis y uno de los comensales más abundantes (5-40% de abundancia) en el dorso de la lengua, exhibe una mejor formación de biopelículas de una manera dependiente de H₂O₂ durante el co-cultivo con *A. Actinomycescomitans*, mientras que simultáneamente inhibe el crecimiento de este periodontopatógeno. Además, *S. parasanguinis* redujo la formación de biopelículas de *S. mutans* y su patogénesis, en un modelo de infección de caries de rata de una manera dependiente de nitrito y H₂O₂. En la misma línea, Huffines y Scofield (2019) revelaron un nuevo mecanismo por el cual *S. parasanguinis* protege contra los patógenos cariogénicos, específicamente al bloquear la utilización de sacarosa por parte de *S. mutans*.

A su vez, algunos estudios genómicos muestran que la composición bacteriana de lesiones de caries en esmalte y en cavidades dentinarias son diferentes, streptococci, *Rothia*, *Leptotrichia* y *Veillonella*, por ejemplo, se encuentran más prevalentes en lesiones de caries de esmalte, en cambio, *Lactobacillus*, *Shlegelella*, *Pseudoramibacter* y *Atopobium* son más características de lesiones de caries dentinarias. En relación con *S. mutans*, se encontró una proporción significativamente baja en todas las muestras analizadas, que van desde 0,73% en lesiones de esmalte a 0,48% en dentina expuesta y 0,02% en lesiones de dentina ocultas (o lesiones de caries tipo ICDAS 4) (Simón-Soro y cols., 2014). Del mismo modo, la colonización temprana de *S. sanguinis* en lactantes ha demostrado que se correlaciona con un retraso significativo en la colonización de *S. mutans* (Caufield y cols., 2000).

Interacciones bacteria - hongo

Por su parte, existen también interacciones entre bacterias y hongos. El género *Candida* son hongos unicelulares del tipo levadura que están presentes en las biopelículas en gran parte de la población, tanto en condiciones de salud oral como en enfermedad de caries (Coronado-Castellote y cols., 2013).

Según un estudio de Lozano y cols. (2017), *C. albicans* es la especie más prevalente en niños preescolares con caries activas o libres de caries y solo la especie *C. dubliniensis* está presente en niños con enfermedad de caries avanzada, lo cual determina que estas levaduras interactúan con otros microorganismos tanto en salud oral como en estados patogénicos.

Las investigaciones en cuanto a las interacciones de levaduras con bacterias en microbiomas orales han aumentado. Un ejemplo de interacción mutuamente beneficiosa es la coagregación, fenómeno que tiene lugar en biopelículas orales donde la adhesión de *C. albicans* a bacterias comensales se considera crucial para que éstas puedan colonizar la cavidad oral. En cambio, la interacción entre *C. albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, por ejemplo, se describe como competitiva y antagónica por naturaleza. Otra interacción intrigante es la que ocurre entre *Staphylococcus aureus* y *C. albicans*, que, aunque todavía no está completamente caracterizada, parece ser inicialmente sinérgica (Marsh y cols., 2015), muy similar a la interacción entre *S. gordonii* y *C. albicans* que según el estudio de Ricker y cols. (2014), ocurre mediante la enzima glucosiltransferasa, a través de la cual esta bacteria se une a biopelículas de *Candida*.

Se ha estudiado cómo coagrega *C. albicans* con *S. mutans* y *S. sobrinus*, que según el estudio de Fragkou y cols. (2016), se concluye que estos tres microorganismos patobiontes están presentes en mayor cantidad en estados patológicos, es decir, en lesiones de caries activas. Además, la co-infección con *C. albicans* y *S. mutans* resultó en un aumento de la biomasa de la biopelícula y de la cantidad de lesiones de caries en comparación con la infección de una sola especie

en un modelo de infección de caries en ratas (Yang y cols., 2018). Sin embargo, el estudio de Huffines y Scofield (2020) demostró que *S. parasanguinis*, además de inhibir el desarrollo de biopelículas de *S. mutans*, también restringe la incorporación de *C. albicans* en biopelículas de múltiples especies, por lo que interfiere en este sinergismo de la levadura y *S. mutans*.

Pese a lo anterior, los resultados del trabajo de Willems y cols. (2016) sugieren que *C. albicans* no es un microorganismo cariogénico, ya que modula el pH en biopelículas de distintas especies bacterianas a valores superiores al pH crítico de desmineralización del esmalte, lo cual podría prevenir la aparición de lesiones de caries. Por lo tanto, según todos estos antecedentes, no existe aún un total conocimiento del rol de esta levadura como microorganismo comensal asociado a bacterias benéficas para el hospedero y como un patobionte en la enfermedad de caries.

Respecto a lo mencionado previamente, no existe evidencia de cómo esta levadura interacciona y el rol que cumple con microorganismos asociados a salud oral como *S. sanguinis*, un colonizador temprano de la biopelícula, el cual secreta H_2O_2 , un componente antimicrobiano que compite con otros *Streptococcus* orales (Kreth y cols., 2009). Adicionalmente, se desconoce el efecto del H_2O_2 en levaduras tipo *C. albicans*, se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producen stress oxidativo, pero se desconoce el efecto de este compuesto en aislados clínicos orales formando biopelículas y los factores bióticos/abióticos que actúan sobre el microambiente oral, de tal forma que esta biopelícula comensal puede volverse cariogénica.

Factores de virulencia

Formación de hifas

Candida albicans es un microorganismo patobionte que cada vez más, se involucra en infecciones fúngicas orales y que ha logrado tener una resistencia a

antifúngicos gracias a sus factores de virulencia. Su patogenicidad está directamente relacionada con su gran adaptabilidad metabólica a ambientes desfavorables. Además, ésta es un hongo dimorfo que se presenta en forma levaduriforme o blastoconidio y en forma de micelio que comprende hifas y pseudohifas (Ribeiro y cols., 2016) (Figura 1).

C. albicans presenta varios factores de virulencia que podrían influir en el desarrollo de lesiones de caries. Estos factores incluyen biomoléculas de reconocimiento del hospedero (adhesinas), morfogénesis (la transición reversible entre células del estado de levadura al estado filamentoso o hifa), adhesión a las superficies de los dientes, degradación de la matriz extracelular y de proteínas, colonización de la mucosa oral, fermentación de carbohidratos (capacidad acidogénica y fermentativa que contribuye a la acidez y también la secreción de aspartil proteasas y fosfolipasas, en donde el pH bajo es óptimo para la actividad de éstas (Li y cols., 2014).

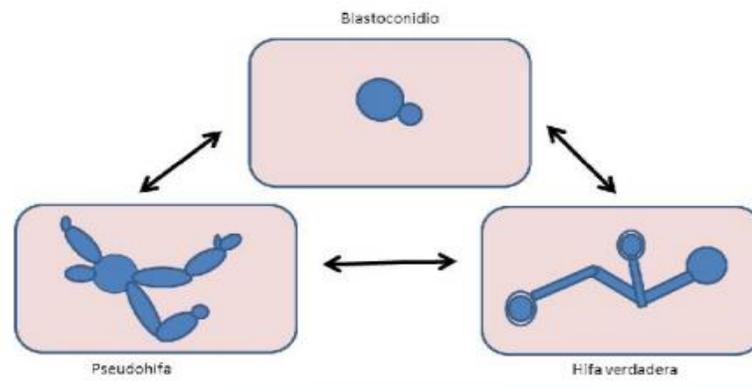


Figura 1: Morfogénesis de *C. albicans*. Se observa la transición morfológica reversible que experimenta entre blastoconidio, pseudohifa e hifa verdadera. Adaptado del artículo «*Morphogenesis and cell cycle progression in Candida albicans*», Berman J, 2006.

C. albicans logra formar biopelículas de la siguiente manera: comienza con la adhesión de células a una superficie de soporte, seguida de proliferación celular que forma una capa basal a lo largo de la superficie. Luego se induce el crecimiento filamentoso mediante la formación de hifas, las cuales contienen receptores proteicos que se regulan con la presencia de bacterias y de esta manera la biopelícula se desarrolla (Peters y cols., 2010). Posteriormente, ésta se encierra

gracias a la secreción de la matriz extracelular, formando así una arquitectura tridimensional compleja (Figura 2). Finalmente, las células se pueden dispersar desde la biopelícula madura hacia otros sitios cercanos colonizándolos; de esta forma las biopelículas protegen a *C. albicans* de los antifúngicos y también pueden ayudar a las células a escapar del sistema inmune del hospedero (Chen y Lan, 2015).

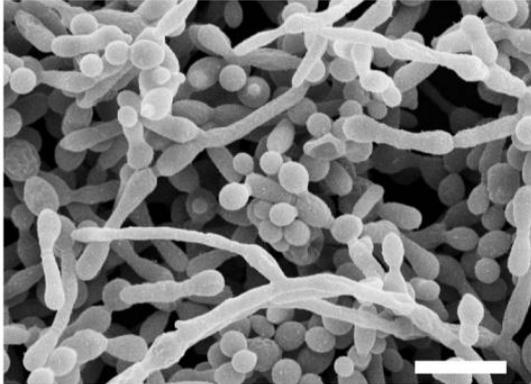


Figura 2: SEM (Microscopía Electrónica de Barrido) de una biopelícula de *C. albicans* madura (48 h). La biopelícula está compuesta por los distintos estados de levadura, yemas, hifas y pseudohifas. La mayor parte del material exopolimérico (matriz) se pierde debido a la deshidratación durante los procedimientos de SEM. Bar mide 10 μm . Adaptado del artículo «*Candida Biofilms: an Update*» Ramage y cols. (2005).

Peróxido de Hidrógeno

Algunas especies orales del género *Streptococcus*, son conocidas por su producción y secreción de sustancias antimicrobianas, una de ellas es el H_2O_2 (Kreth y cols., 2017). Se ha descrito que la producción de estas sustancias podría considerarse como un mecanismo de protección importante de los colonizadores iniciales de la comunidad de biopelículas residentes contra especies invasoras y competidoras. *S. sanguinis* secreta H_2O_2 durante el crecimiento aeróbico como subproducto del metabolismo, el cual puede difundirse a través de la membrana celular e inhibir especies competidoras en las proximidades (Zhu y cols., 2012).

Además, se ha descrito que el H_2O_2 producido no es un simple subproducto del metabolismo, sino que cumple un rol en varios aspectos de la ecología de la biopelícula bacteriana oral, en la señalización y las interacciones entre especies. En segundo lugar, debido a la naturaleza inhibidora de éste en el crecimiento de otras especies, se asocia con aquellas que son compatibles y que al mismo tiempo son las productoras. Por lo tanto, la secreción de H_2O_2 podría ayudar a estructurar el

desarrollo inicial de la biopelícula. Por otro lado, el entorno oral alberga peroxidasa salivales que son potentes en la eliminación de H_2O_2 . Sin embargo, teniendo en cuenta que el 80% de los componentes iniciales de la biopelícula oral son *Streptococcus*, el H_2O_2 podría tener una influencia no menor en el desarrollo de la biopelícula y en la adaptación ambiental, algo poco estudiado aún (Kreth y cols., 2017).

Aislados clínicos

Existe una amplia literatura describiendo que, en estudios microbiológicos y en ensayos clínicos aleatorizados, las cepas o aislados clínicos de microorganismos (bacterias, hongos e incluso virus), obtenidos de muestras biológicas desde sujetos sanos o enfermos tanto a nivel sistémico como oral, presentan una variedad de diferencias a nivel fenotípico y genotípico con respecto a las cepas de referencia o silvestres. Lo anterior conlleva a diferencias en el tiempo de proliferación, adhesión, secreción de factores de virulencia, resistencia o sensibilidad a antimicrobianos, entre otros. Por lo tanto, debido a estas características mencionadas es que es necesario evaluar diseños experimentales *in vitro* o *in vivo* desarrollados como modelos de estudio para enfermedades humanas, incluidas las orales, con aislados clínicos provenientes de los sitios de colonización en donde éstas ejercen su acción microbiana.

En este estudio se utilizarán aislados clínicos de *C. albicans* obtenidos desde saliva de niños preescolares con lesiones de caries y libre de caries, las cuales fueron previamente identificadas mediante técnicas microbiológicas y moleculares (PCR y secuenciación). Los ensayos de formación de biopelículas *in vitro* de estos aislados clínicos con bacterias, previamente se acondicionarán con salivas no estimuladas provenientes de individuos con lesiones de caries, con historia de caries y libre de caries, de forma que podamos determinar si existen diferencias en la capacidad de formación de biopelículas atendiendo a que la composición y concentración total de proteínas se modifica en salivas provenientes de distinto origen.

Desde todos los antecedentes expuestos es que se plantean las siguientes preguntas de investigación:

En ensayos de formación de biopelículas *in vitro* acondicionados con salivas de distinto origen, ¿Existirán diferencias en la capacidad de formación de biopelículas, filamentación y en la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans*, en presencia de *S. sanguinis*? y a su vez, ¿Qué efecto tendrá el H₂O₂ en la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans*?

3. HIPÓTESIS

La capacidad de formación de biopelículas, viabilidad y filamentación de aislados clínicos de *C. albicans* presenta diferencias en presencia de *S. sanguinis* y en salivas provenientes de distinto origen. Así mismo, el efecto del H₂O₂ difiere en la viabilidad celular según el aislado clínico de *C. albicans*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de formación de biopelículas, viabilidad y filamentación de aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis* y en salivas provenientes de distinto origen. Además, determinar el efecto del H₂O₂ en la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de aislados clínicos de *C. albicans* con *S. sanguinis* en presencia de salivas provenientes de distinto origen.
2. Cuantificar la viabilidad de los aislados clínicos de *C. albicans* en la formación de biopelículas con *S. sanguinis* en presencia de salivas provenientes de distinto origen.
3. Establecer la capacidad de filamentación de aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis*.
4. Determinar el efecto del H₂O₂ en la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans*.

5. METODOLOGÍA

Los ensayos respecto a los objetivos específicos 1 y 2 mencionados a continuación fueron realizados durante el año 2019, como parte de las actividades desarrolladas tanto en la UTE Proyecto de Investigación III como en la UTE Ejecución Proyecto de Investigación.

Microorganismos, condiciones de crecimiento y obtención de salivas: En este estudio se utilizaron dos aislados clínicos de *C. albicans*, las cepas P1-1 y P25-4, provenientes de saliva de individuos con lesiones de caries activas (ICDAS II = 5-6) y libres de caries (ICDAS II = 0), respectivamente (los aislados clínicos fueron identificados como *C. albicans* mediante técnicas moleculares como PCR y posterior secuenciación, en un proyecto previo de la Dra. Lozano). Los individuos reclutados correspondieron a niños preescolares desde jardines infantiles del área norte de la región metropolitana. Los exámenes intraorales fueron realizados por los cirujanos dentistas Dres. Gonzalo Rodríguez y Rodrigo Cabello, los cuales están entrenados, calibrados y son expertos en criterios ICDAS II. Los datos de cada niño se anotaron en una planilla en la cual se registraron los criterios ICDAS por superficie y, los grupos de estudio fueron divididos en aquellos libres de caries (ICDAS II = 0), los que presentaron ICDAS II = 2-3 y en aquellos que presentaron ICDAS II = 5-6). Con respecto a las muestras de saliva (no estimulada), éstas se recolectaron de cada niño en la mañana, entre las 10 y 12 AM, al menos 2 horas después del desayuno, ya sea por expectoración o utilizando una pipeta Pasteur plástica, suave (Todo lo anterior está ampliamente descrito en Lozano y cols. (2017), además, se adjunta el respectivo Consentimiento Informado en Anexo 1). Estas salivas fueron también utilizadas para los ensayos de biopelículas, las cuales fueron filtradas y mezcladas con EDTA, para minimizar la degradación de proteínas y, fueron mantenidas a -80°C

Además, se utilizaron las bacterias *S. sanguinis* SK36 (facilitada por el Dr. Jens Kreth, Oregon Health and Science University, USA) y *S. mutans* ATCC 25175. El medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI; BD) fue utilizado para el crecimiento

individual de los pre-cultivos bacterianos con 5% CO₂ durante 18 h a 37°C. El medio Sabouraud-dextrose (SD; Oxoid) fue usado para pre-cultivos aeróbicos de las cepas de levaduras durante la noche a 37°C. El medio Todd Hewitt Broth (THB; BD) fue usado en los ensayos de formación de biopelículas mixtas (previamente estandarizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología oral).

Ensayos de formación de biopelículas entre aislados clínicos de *C. albicans* y especies del género *Streptococcus*: La formación de biopelículas se realizó según la metodología reportada por do Rosário Palma y cols. (2018), con algunas modificaciones. Brevemente, placas de cultivo celular de 96 pocillos, estériles, de fondo plano (SPL Life Sciences) se incubaron con o sin saliva proveniente de individuos libres de caries o con historia de caries o con lesiones de caries activas durante 30 min a 37°C. Luego de este tiempo de incubación la saliva fue retirada de cada uno de los pocillos (lo anterior para determinar si la adhesión inicial de las levaduras se favorece en presencia de proteínas salivales adheridas en los pocillos de la placa). Luego, se inocularon 100 µL de un cultivo de cada uno de los aislados clínicos de *C. albicans* (aprox. 10⁷ células/mL) en 100 µL de medio THB. La placa se incubó bajo agitación a 75 × g a 37°C durante 90 min para promover la adhesión inicial de las levaduras. Luego, 200 µL de suspensión del cultivo fue aspirado y cada pocillo se lavó dos veces con NaCl al 0,85% para eliminar las células no unidas. Posteriormente, 100 µL de suero fetal bovino (SFB; Gibco, NY, EE.UU.) se añadió a cada pocillo antes de incubar la placa durante 2 h más, bajo agitación (para favorecer la formación de hifas). Luego de completadas las 2 h, los pocillos se inocularon con 50 µL de *S. sanguinis* o *S. mutans* (aprox. 10⁷ células/mL) + 60 µL de medio THB. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 48 h. El medio THB se cambió a las 24 h de incubación. Como controles se incluyeron biopelículas de cada una de las levaduras y de cada una de las bacterias por sí solas, además de medio THB con SFB. Se realizaron dos experimentos independientes, cada uno por duplicado con cada uno de los tres tipos de saliva y sin saliva.

Cuantificación de formación de biopelículas: Una vez finalizadas las 48 h de ensayos de formación de biopelículas, se utilizó el método de cristal violeta para cuantificación, según Merrit y cols. (2005) con menores modificaciones. Este consiste en eliminar el sobrenadante de cada pocillo y lavar cada uno de ellos entre 1-3 veces con 200 μ L de agua estéril destilada (para eliminar células no adheridas). Los microorganismos unidos fueron fijados con 250 μ L de metanol y incubados durante 15 min. Posteriormente, el metanol fue eliminado de cada pocillo y las placas aireadas. Luego los microorganismos adheridos fueron teñidos con 250 μ L de cristal violeta al 0,1% durante 15 min. Después de retirar el cristal violeta, los pocillos fueron lavados 3 veces con 200 μ L de agua estéril destilada y aireadas por unos minutos. Las células fueron solubilizadas con 250 μ L de etanol absoluto, incubando durante 10 min. Finalmente, la absorbancia se determinó espectrofotométricamente a 595 nm en un lector de placas (Synergy, Biotek).

Recuento de células viables: Se realizó según Lozano y cols. (2017) con modificaciones menores. Al final de los ensayos (después de 48 h de incubación), las biopelículas desarrolladas en medio TBH + SFB fueron dispersadas mediante un sonicador con un pulso de 30 s a 7 W. Luego, 100 μ L de cada uno de los pocillos fueron transferidos a un tubo Eppendorf estéril con 900 μ L de NaCl al 0,9% para realizar las diluciones seriadas respectivas. Esto nos permitió visualizar las colonias desarrolladas de levaduras en las placas con medio SD agar, luego de incubarlas a 37°C durante 48 h en condiciones de aerobiosis. Se realizó recuento de las colonias desarrolladas de levadura en los duplicados y se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL).

Cuantificación de filamentación: El método de filamentación *in vitro* fue realizado según lo descrito por Ribeiro y cols. (2016) en medio THB. Se evaluaron los siguientes grupos experimentales:

- C. albicans* P1-1.
- C. albicans* P1-1 + SFB.
- C. albicans* P1-1 + SFB + *S. sanguinis* o *S. mutans*.
- C. albicans* P25-4.

-*C. albicans* P25-4 + SFB.

-*C. albicans* P25-4 + SFB + *S. sanguinis* o *S. mutans*.

En placas de cultivo celular de 24 pocillos, estéril, de fondo plano (Corning™ Costar™, Thermo Fisher Scientific) se agregó 1 mL de agua destilada suplementada con SFB al 10% (cuando corresponde) e inoculado con 110 µL de un cultivo de *C. albicans* (P1-1 o P25-4; apróx. 10^7 células/mL). A aquellos grupos experimentales que son de especies mixtas, se les agregó 100 µL de un cultivo de *S. sanguinis* o *S. mutans* (apróx. 10^7 células/mL). Los grupos experimentales donde está presente solo *C. albicans*, se agregó 100 µL de NaCl al 0,85%. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se tomaron 50 µL de cada pocillo, de cada uno de los grupos experimentales, se depositaron en un portaobjetos y se observaron mediante microscopio óptico a 40X. Se cuantificaron 10 campos microscópicos por portaobjetos. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

Ensayo de viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans* en H₂O₂ (Test de Concentración Inhibitoria Mínima): Se realizó para evaluar la concentración de H₂O₂ que disminuye el crecimiento de ambos aislados clínicos de *C. albicans*, para esto nos basamos en la metodología descrita por Al-Bakri y cols. (2009). En placas de 96 pocillos, estériles, de fondo plano, se inocularon 100 µL de un cultivo de levadura (apróx. 10^7 células/mL) en medio THB suplementado con 20 µL de distintas concentraciones decrecientes de H₂O₂ (0,01; 0,005 y 0,0075 mM diluídas en agua destilada estéril) en un volumen final de 200 µL. El control positivo fue medio THB inoculado con levadura sin suplementar con H₂O₂ y el control negativo fue medio THB estéril sin inocular con levadura. Además, se utilizó una cepa silvestre de *C. albicans* (ATCC 90029) para comparar. La placa se incubó en condiciones microaerófilas durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se determinó la absorbancia de cada pocillo a 560 nm en un lector de placas (Synergy, Biotek). Este experimento se realizó una sola vez por triplicado.

Análisis estadístico: Los resultados de absorbancia, respecto a la formación de biopelículas, concentración inhibitoria de H₂O₂ y también la cuantificación de

filamentación, se expresaron como promedios y desviación estándar. El recuento de células viables de levaduras se expresó en mediana y rangos. Los datos obtenidos se expresaron como una prueba de concepto, descriptivos e informativos debido al bajo número de réplicas biológicas. Solo se realizó test estadístico, paramétrico ANOVA para analizar los datos de filamentación de levaduras. Para este análisis, se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue $<0,05$.

6. RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de aislados clínicos de *C. albicans* con *S. sanguinis* en presencia de salivas provenientes de distinto origen.

Formación de biopelículas con saliva proveniente de individuos libres de caries

Con respecto a la formación de biopelículas de la levadura cepa P25-4 (proveniente de individuo libre de caries), en presencia o ausencia de saliva, se pudo observar que no habría diferencias, debido a los valores de absorbancias obtenidas en cada condición experimental, a excepción de cuando está en presencia de *S. mutans* (Figura 3). Además, se puede observar que las absorbancias obtenidas son mayores cuando la levadura está en presencia de *S. sanguinis* o *S. mutans* con respecto al cultivo individual, ya sea de la levadura o cualquiera de las bacterias mencionadas. Cabe destacar que la absorbancia o la capacidad de formar biopelículas de la cepa P25-4 junto a *S. mutans* es mayor en ausencia de saliva.

En cuanto a la formación de biopelículas de la levadura cepa P1-1 (proveniente de individuo con lesiones de caries activas), los valores de absorbancia fueron similares tanto en cultivos individuales de la levadura como de las bacterias en presencia o ausencia de saliva, pero se observó que en condiciones mixtas, esta cepa tiende a presentar mayor capacidad de formar biopelículas en presencia de *S. mutans* o *S. sanguinis* debido a las absorbancias obtenidas (Figura 4).

Al analizar las figuras 3 y 4, podemos observar que existe una mayor absorbancia o capacidad de formar biopelículas de la cepa P25-4 con respecto a la cepa P1-1, en presencia de cualquiera de las dos bacterias.

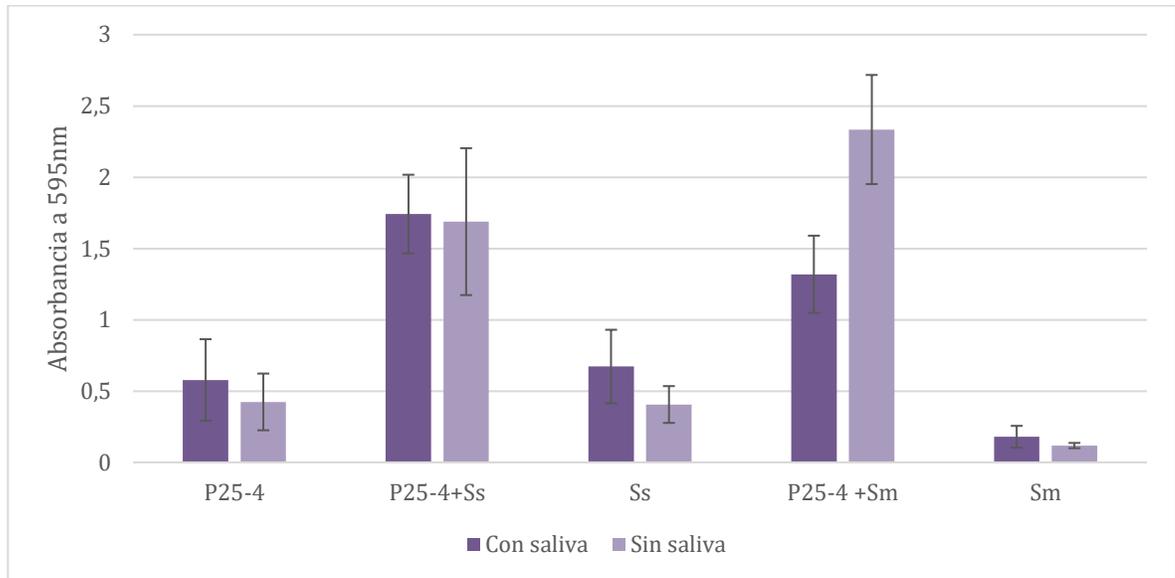


Figura 3: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P25-4. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos libre de caries. Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*.

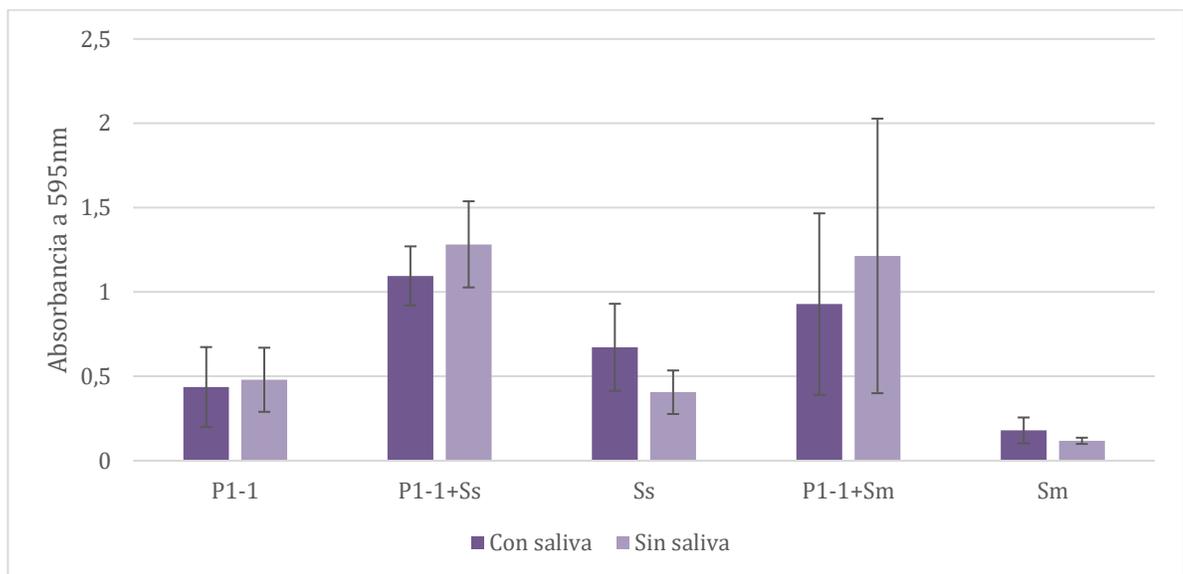


Figura 4: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P1-1. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos libre de caries. Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*.

Formación de biopelículas con saliva proveniente de individuos con historia de caries

A partir de los datos obtenidos y representados en la figura 5, se puede observar que no existen diferencias en la capacidad de formar biopelículas de la cepa P25-4 en cualquier condición experimental en presencia o ausencia de saliva. Es notable que las mayores absorbancias se encuentran en las condiciones cuando esta levadura se encuentra en presencia de cada una de las bacterias. Cabe destacar también una mayor absorbancia obtenida de la levadura en presencia de *S. mutans* con respecto a *S. sanguinis*.

Con respecto a la cepa P1-1 (Figura 6), no se observaron diferencias en las absorbancias en presencia o ausencia de saliva cuando la levadura está en presencia de las bacterias. Las mayores absorbancias se obtuvieron cuando la levadura estaba en presencia de cualquiera de las bacterias respecto a los cultivos individuales.

Al comparar las figuras 5 y 6, podemos mencionar que las mayores absorbancias o mayores capacidades de formar biopelículas lo presenta la cepa P25-4 con respecto a P1-1 en presencia de cualquiera de las bacterias.

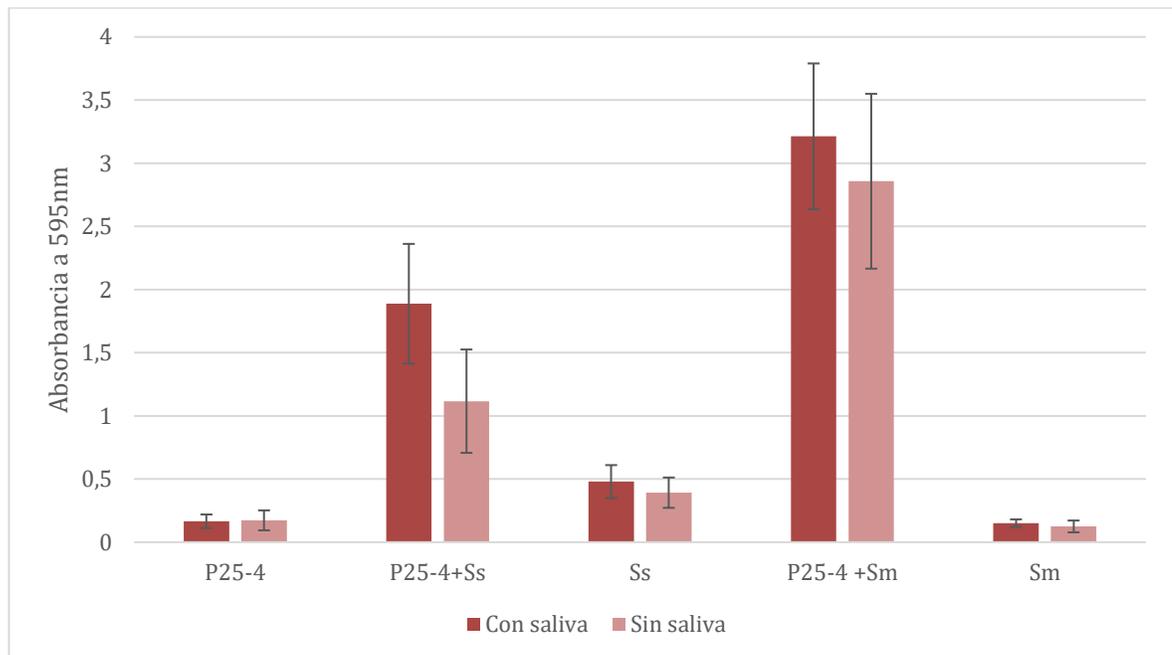


Figura 5: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P25-4. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos con historia de caries. Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*

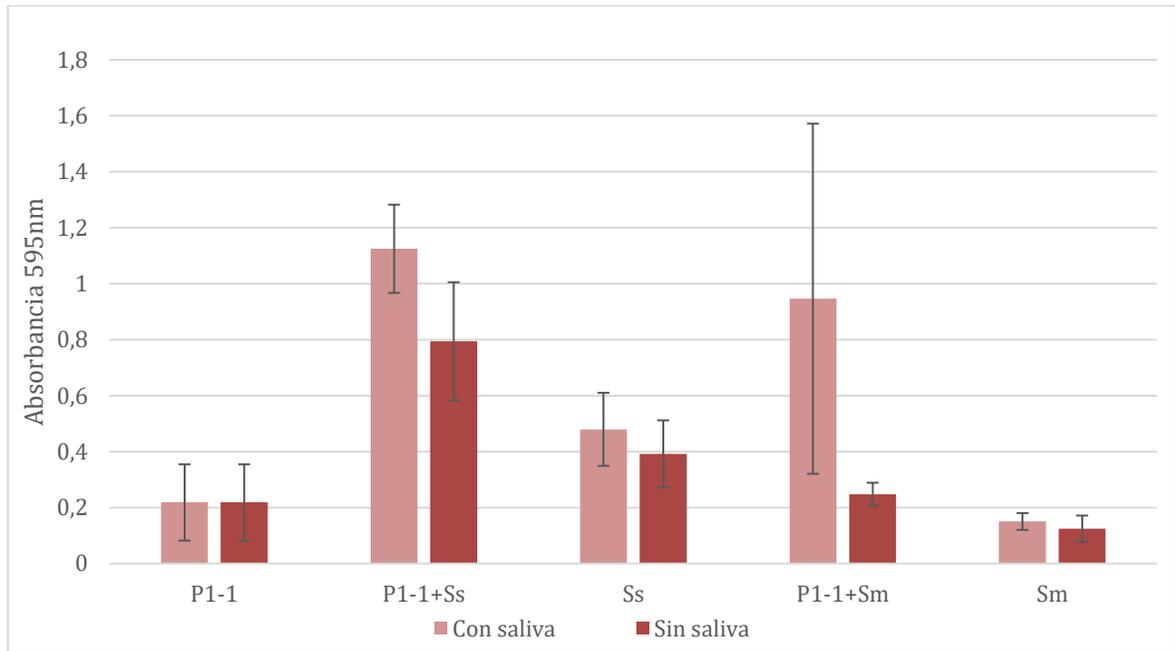


Figura 6: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P1-1. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos con historia de caries. *Ss*: *Streptococcus sanguinis*; *Sm*: *Streptococcus mutans*.

Formación de biopelículas con saliva proveniente de individuos con caries activas

Con respecto a la formación de biopelículas de la levadura cepa P25-4, en presencia o ausencia de saliva, se puede observar que no hubo diferencias, debido a los valores de absorbancias obtenidas en cada condición experimental. Al igual que en la condición con saliva de individuos con historia de caries, es evidente que las mayores absorbancias se encuentran en las condiciones cuando esta levadura se encuentra en presencia de cada una de las bacterias respecto a los cultivos individuales. Incluso también se observa una mayor absorbancia obtenida de la levadura en presencia de *S. mutans* con respecto a *S. sanguinis* (Figura 7).

En cuanto a la cepa P1-1, en primer lugar, no se observaron diferencias en cualquiera de las condiciones experimentales, en presencia o ausencia de saliva. En segundo lugar, no presenta diferencias en las absorbancias la levadura y las bacterias en cultivo individual, pero cuando éstas están en co-cultivo, aumentan notablemente su capacidad de formar biopelículas (Figura 8). Por último, la capacidad de formar biopelículas o las absorbancias obtenidas de esta cepa en

cultivo mixto, son similares a las obtenidas por la cepa P25-4 en cultivo mixto y en presencia o ausencia de esta saliva.

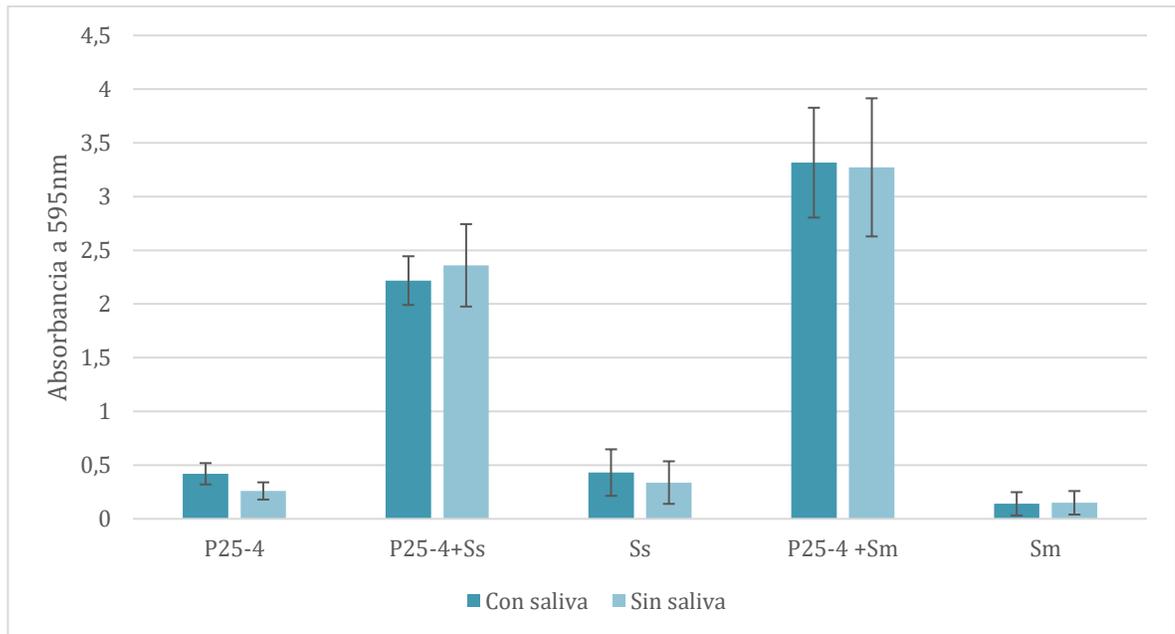


Figura 7: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P25-4. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos con caries activas. Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*.

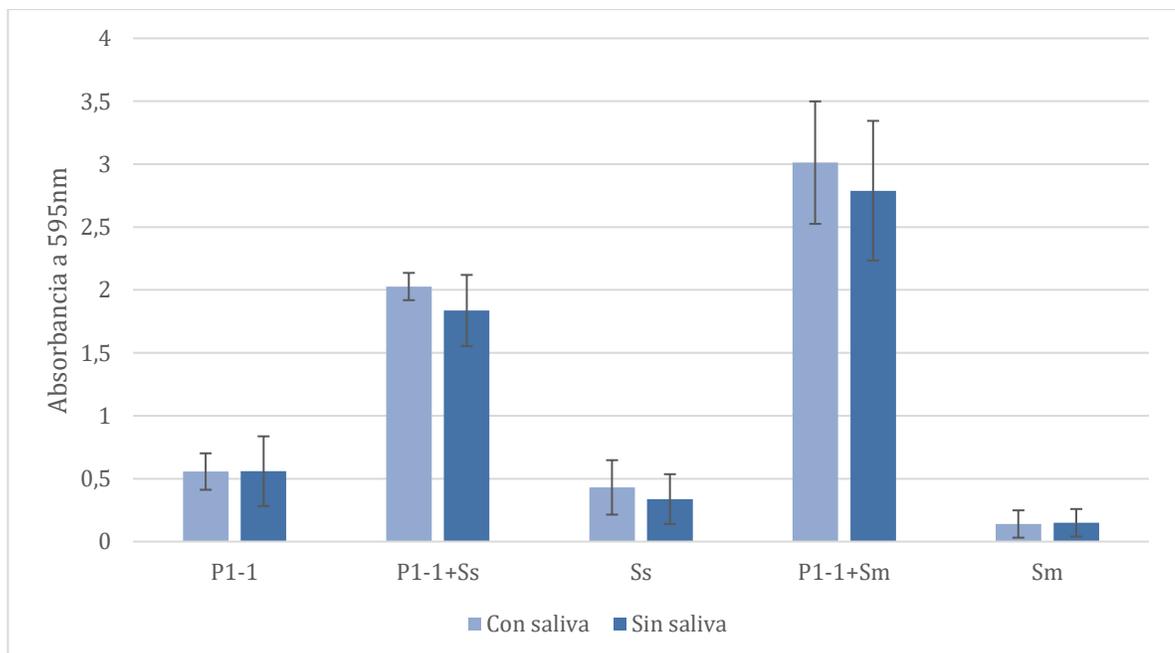


Figura 8: Capacidad de formar biopelículas del aislado clínico P1-1. Las barras representan el promedio de valores de absorbancia (595 nm) de cada condición experimental, en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos con caries activas. Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*.

Objetivo 2: Cuantificar la viabilidad de los aislados clínicos de *C. albicans* en la formación de biopelículas con *S. sanguinis* en presencia de salivas provenientes de distinto origen.

Viabilidad de aislados clínicos con saliva proveniente de individuos libres de caries

Al examinar el recuento de levaduras de cepa P1-1 en cultivo individual, se determinó que hubo un leve aumento al adicionarle saliva proveniente de individuos libres de caries, al igual que en co-cultivo con *S. sanguinis*, en presencia o ausencia de esta saliva (Tabla 1). Por otro lado, cuando la levadura estuvo en co-cultivo con *S. mutans*, el recuento fue muy similar en presencia o ausencia de saliva. Al comparar los recuentos de la levadura en cultivo individual, y junto a las bacterias en cuestión, se observó un mayor recuento de levaduras cepa P1-1 cuando estuvo en co-cultivo con *S. sanguinis* en comparación al crecimiento individual de la levadura o junto a *S. mutans*

En el caso de la levadura cepa P25-4, ésta presentó el mayor recuento en el cultivo individual, sin saliva y sin bacterias. Por tanto, al adicionar saliva proveniente de individuos libres de caries, el recuento disminuyó tanto en el cultivo individual de la levadura o junto a *S. sanguinis* o *S. mutans* (Tabla 1).

Tabla 1: Recuentos de levaduras (UFC/mL), en ausencia o presencia de saliva proveniente de individuos libres de caries.

Condición experimental	Recuento (UFC/mL)	
	Mediana	Rangos

<i>C. albicans</i> P1-1	$3,4 \times 10^7$	$1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva	$4,2 \times 10^7$	$0 - 8 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. sanguinis</i>	1×10^8	$5 \times 10^7 - 1,86 \times 10^9$
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	2×10^8	$4,4 \times 10^7 - 2,53 \times 10^9$
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. mutans</i>	$3,9 \times 10^7$	$1 \times 10^7 - 9 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. mutans</i>	4×10^7	$2,4 \times 10^7 - 6 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P25-4	$7,3 \times 10^7$	$4 \times 10^7 - 9 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva	$2,75 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7 - 6 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P25-4 + <i>S. sanguinis</i>	$5,7 \times 10^7$	$2 \times 10^7 - 8 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	$3,55 \times 10^7$	$1 \times 10^7 - 6 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> (P25-4) + <i>S. mutans</i>	$5,25 \times 10^7$	$3 \times 10^7 - 9 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> (P25-4) + Saliva + <i>S. mutans</i>	1×10^7	$7 \times 10^6 - 2 \times 10^7$

Viabilidad de aislados clínicos con saliva proveniente de individuos con historia de caries

Cuando la levadura cepa P1-1 fue cultivada en presencia o ausencia de saliva proveniente de individuos con historia de caries, tuvo un recuento bastante similar al estar en monocultivo o en cultivo mixto con *S. sanguinis*, pero en presencia de *S. mutans* (ya sea en presencia o ausencia de saliva) la mediana del recuento fue menor comparado a las anteriores condiciones experimentales mencionadas (Tabla 2).

Por su parte, la levadura cepa P25-4 tuvo valores similares de recuento al comparar su crecimiento individual o junto a cualquiera de las bacterias utilizadas en ausencia de saliva. Sin embargo, cuando se adicionó saliva proveniente de individuos con historia de caries la levadura disminuyó su recuento en todas las situaciones experimentales, es decir, en cultivo individual y en presencia de *S. sanguinis* o *S. mutans* (Tabla 2).

Tabla 2: Recuentos de levaduras (UFC/mL), en ausencia o presencia de saliva proveniente de individuos con historia de caries.

Condición experimental	Recuento (UFC/mL)	
	Mediana	Rangos
<i>C. albicans</i> P1-1	4,65 x10 ⁷	3x10 ⁷ -8x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva	4,1 x10 ⁷	3x10 ⁷ - 7x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. sanguinis</i>	3,35 x10 ⁷	1,6 x10 ⁷ - 6x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	4,2 x10 ⁷	1x10 ⁷ - 5x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. mutans</i>	1x10 ⁷	6x10 ⁶ - 2x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. mutans</i>	2x10 ⁷	1,6 x10 ⁷ - 7x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4	7,3 x10 ⁷	4x10 ⁷ -10x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva	4,1x10 ⁷	3,4x10 ⁷ - 6x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + <i>S. sanguinis</i>	5,2x10 ⁷	2x10 ⁷ - 8x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	3,6x10 ⁷	1x10 ⁷ - 6x10 ⁷

<i>C. albicans</i> (P25-4) + <i>S. mutans</i>	$6,15 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7 - 10 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> (P25-4) + Saliva + <i>S. mutans</i>	1×10^7	$7 \times 10^6 - 2 \times 10^7$

Viabilidad de aislados clínicos con Saliva proveniente de individuos con caries activas

El recuento de la levadura cepa P1-1 en presencia y ausencia de saliva proveniente de individuos con caries activas fue muy similar. A su vez cuando se cultivó junto a *S. sanguinis* también tuvo un recuento similar, ya sea con saliva o en ausencia de ésta, pero junto a *S. mutans* se observó una leve disminución en el recuento con y sin saliva en comparación al recuento de la levadura en cultivo individual y con *S. sanguinis* (Tabla 3).

En cuanto a la cepa P25-4 el recuento de todas las condiciones experimentales en presencia de saliva fue menor al recuento de las condiciones sin saliva, ya sea la del crecimiento individual de la levadura, como en cultivo mixto con *S. sanguinis* o *S. mutans*. A su vez, se observó una mayor mediana de recuento de levaduras, cuando ésta estaba en monocultivo, respecto a cuando estaba en co-cultivo con cada una de las bacterias (Tabla 3).

Tabla 3: Recuentos de levaduras (UFC/mL), en ausencia o presencia de saliva proveniente de individuos con caries activas.

Condición experimental	Recuento (UFC/mL)	
	Mediana	Rangos
<i>C. albicans</i> P1-1	3×10^7	$2 \times 10^7 - 5 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva	$3,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7 - 7 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. sanguinis</i>	$2,85 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7 - 5 \times 10^7$

<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	3,55 x10 ⁷	2,5 x10 ⁷ - 6x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + <i>S. mutans</i>	1,6 x10 ⁷	1x10 ⁷ -3x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P1-1 + saliva + <i>S. mutans</i>	2,25 x10 ⁷	1,9 x10 ⁷ - 4x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4	7,3 x10 ⁷	4x10 ⁷ -9x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva	4,1 x10 ⁷	3,4x10 ⁷ -6x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + <i>S. sanguinis</i>	5,7 x10 ⁷	2x10 ⁷ -8x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva + <i>S. sanguinis</i>	3,55 x10 ⁷	1x10 ⁷ -6x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + <i>S. mutans</i>	5,25 x10 ⁷	3x10 ⁷ -9x10 ⁷
<i>C. albicans</i> P25-4 + saliva + <i>S. mutans</i>	1x10 ⁷	0-2x10 ⁷

Objetivo 3: Establecer la capacidad de filamentación de aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis*.

A partir de los datos obtenidos (Figura 9), se observó una mayor filamentación de ambas cepas de levaduras, al co-existir con bacterias y en presencia o ausencia de suero, respecto al crecimiento individual en ausencia de suero. Cabe señalar que en cultivo mixto con *S. mutans* ambas cepas de levaduras tienden a filamentar aún más que en presencia de *S. sanguinis*, pero la cepa P1-1 junto a *S. mutans* y en presencia de suero logró tener una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al crecimiento individual de la levadura o con *S. sanguinis* y con suero. Por otro lado, es relevante destacar que ambas cepas de levaduras en presencia de suero, al parecer no presentan diferencias significativas en presencia de *S. sanguinis*.

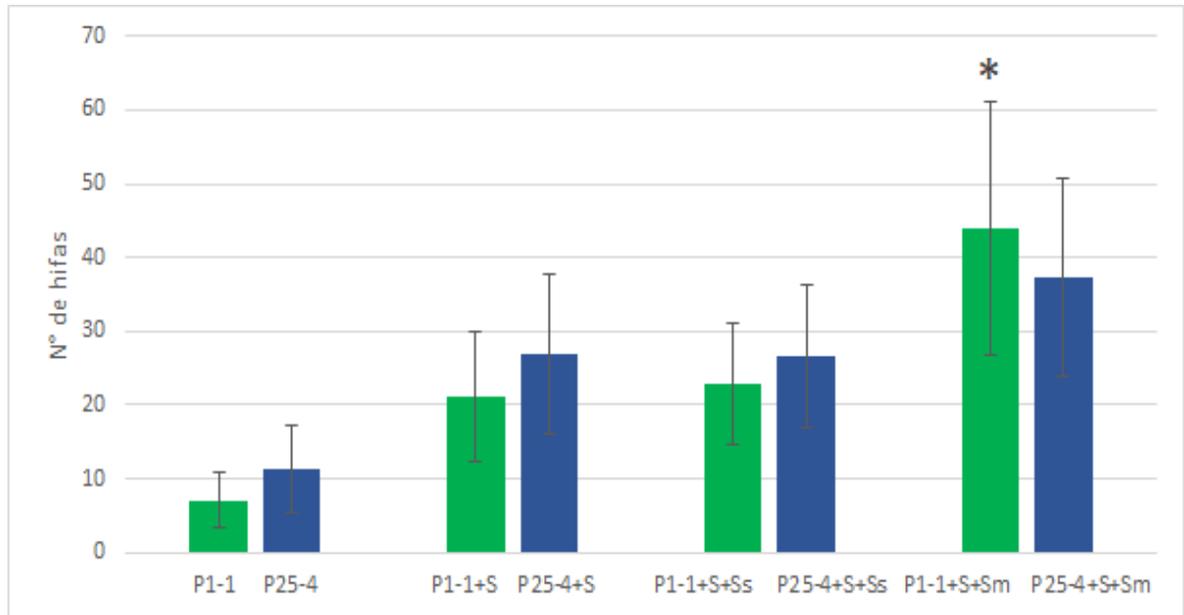


Figura 9: Recuentos de filamentación de las levaduras cepas P1-1 y P25-4, en crecimiento individual o en cultivo mixto con cada una de las bacterias y en presencia o ausencia de suero. Las barras representan el promedio del número de hifas en cada condición experimental. S= suero; Ss: *Streptococcus sanguinis*; Sm: *Streptococcus mutans*. *ANOVA $p < 0,05$.

Objetivo 4: Determinar el efecto del H_2O_2 en la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans*.

Se cultivaron los aislados clínicos de *C. albicans* y una cepa silvestre (ATCC 90029) en presencia de distintas concentraciones de H_2O_2 para determinar el efecto de éste en la viabilidad. Se observó que la absorbancia de ambas cepas de levadura, P1-1 y P25-4, a concentraciones mayores de 0,005 mM de H_2O_2 , disminuyeron drásticamente su viabilidad respecto al control (0 mM de H_2O_2), al igual que la levadura utilizada como control (Figura 10). Por otro lado, se observó que solo la levadura cepa P25-4 presentó mayor viabilidad en presencia de la concentración 0,005 mM de H_2O_2 , aunque su viabilidad en esta concentración es menor respecto al control en ausencia de este compuesto químico. Por lo tanto, se puede especular que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para la cepa P1-1

está bajo la concentración de 0,005 mM de H₂O₂ y la CIM para la cepa P25-4 está entre las concentraciones 0,005 y 0,0075 mM de H₂O₂.

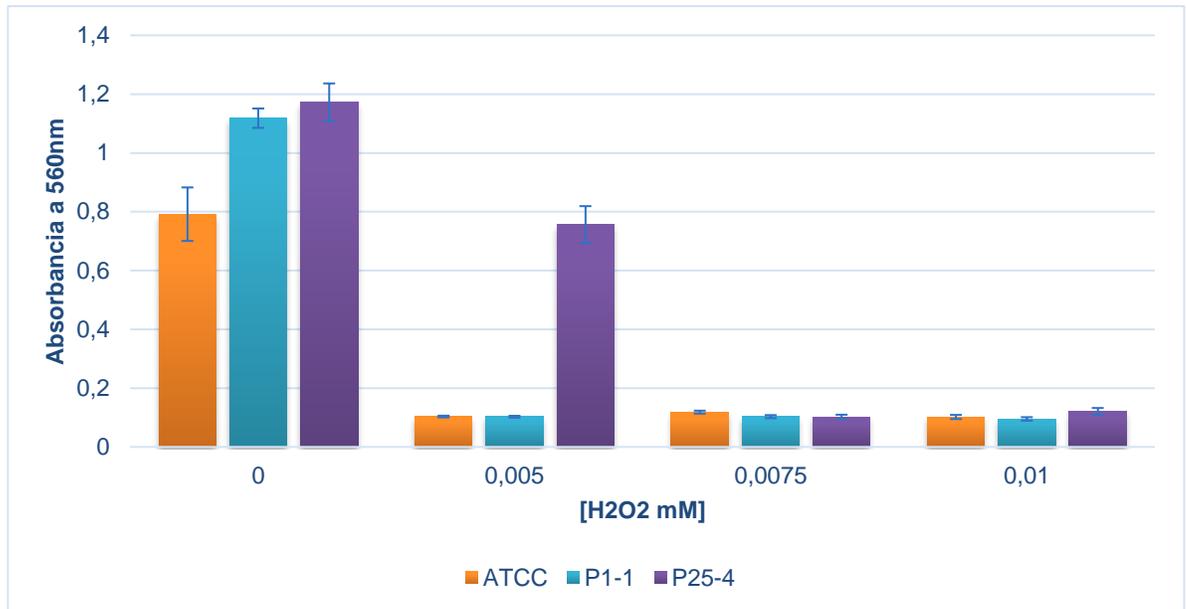


Figura 10: Test de concentración inhibitoria mínima. Valores de absorbancia (560 nm) de viabilidad de las levaduras cepas P1-1 y P25-4, a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0; 0,005; 0,0075 y 0,01 mM). ATCC 90029= levadura control, *C. albicans*.

7. DISCUSIÓN

Durante los últimos años se ha estado investigando el rol de *C. albicans* en la caries dental. Algunos de los estudios han identificado a esta levadura como un microorganismo cariogénico, ya que es capaz de sinergizar junto a *S. mutans* en el inicio y progresión de lesiones de caries, mediante la producción de exopolisacáridos por parte del hongo, que aumentan la biomasa y la cantidad de células viables de *S. mutans* en la biopelícula, además de inducir en la bacteria la expresión de genes virulentos (Jarosz y cols., 2009; Metwalli y cols., 2013; Falsetta y cols., 2014). Pese a lo anterior, hay estudios como el de Willems y cols. (2016), que identifican a *C. albicans* como un microorganismo no cariogénico, previniendo la aparición de lesiones de caries al aumentar el pH de las biopelículas junto a *S. mutans* y de esta forma disminuyendo la pérdida de minerales como el calcio desde la hidroxiapatita. Debido a tal controversia es que este estudio se centró en determinar la capacidad de formación de biopelículas, viabilidad y filamentación de aislados clínicos orales de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis*, un microorganismo comensal asociado a salud bucal a diferencia de *S. mutans*, y en salivas provenientes de distintos orígenes.

El estudio de Djais y cols. (2020), determinó el efecto de una pasta dental con propóleo sobre biopelículas individuales de *S. sanguinis*, *S. mutans* y de *C. albicans*. Usaron la técnica de tinción con cristal violeta para cuantificar las UFC de cada microorganismo. En estos ensayos, parte de la biomasa puede provenir de células sedimentadas en el fondo de los pocillos y posteriormente embebidas por sustancias poliméricas extracelulares. Estos ensayos tiñen tanto las células vivas como las muertas, así como algunos componentes presentes en la matriz de la biopelícula y, por lo tanto, son adecuados para cuantificar la biomasa total de la biopelícula, misma técnica que utilizamos en nuestro estudio. En la investigación mencionada utilizaron saliva artificial para la formación de biopelículas, a diferencia de nuestro estudio que utilizamos saliva proveniente de sujetos con las condiciones descritas en la sección metodología. Los resultados obtenidos del estudio anterior fueron una disminución tanto en la absorbancia obtenida como en el recuento visual

de las UFC de los tres microorganismos mencionados, al estar expuestos a dentífricos con propóleo o sin él, en comparación a las mismas variables medidas de las biopelículas individuales de cada microorganismo sin adicionar pasta dental.

En el caso de nuestro estudio, según los datos obtenidos, las dos cepas de *C. albicans* estudiadas (P1-1 y P25-4) fueron capaces de formar biopelículas junto a las dos bacterias de forma independiente en presencia y en ausencia de saliva. Sin embargo, en la mayoría de las condiciones experimentales existió una mayor absorbancia en las biopelículas mixtas en donde estaban presentes los aislados clínicos de *Candida* con *S. mutans* respecto a estos aislados clínicos con *S. sanguinis*, excepto en el caso de la cepa P1-1 con *S. sanguinis* en presencia de saliva de individuos libre de caries en donde los valores de absorbancia fueron similares a la biopelícula mixta de esta levadura con *S. mutans*. Por otro lado, cuando P1-1 estuvo en presencia de *S. sanguinis* y en presencia de saliva de individuos con historia de caries, presentó un valor de absorbancia mayor que cuando estuvo en presencia de *S. mutans* en la misma condición.

Respecto a lo anterior, son diversos los estudios que se han realizado para evaluar la capacidad de formar biopelículas de *C. albicans* junto a bacterias orales. Por ejemplo, en el estudio de Thein y cols. (2006), se inhibió considerablemente la formación de biopelículas de *Candida* spp. cuando se cultivó en presencia de altas concentraciones de *A. israelii* (1×10^7 and 5×10^6 UFC/mL), una bacteria Gram positivo, de igual manera que cuando la levadura estuvo junto a *L. acidophilus* a concentraciones de 5×10^6 UFC/mL o menos. En el caso de las bacterias periodontales Gram negativo, como *P. gingivalis* y *P. nigrescens*, solo en altas concentraciones fueron capaces de inhibir la formación de biopelículas de *Candida* spp., a una disminución en el recuento de células viables de la levadura. En tanto que *P. aeruginosa* a cualquier concentración es capaz de reducir la formación de biopelícula de la levadura.

En cuanto a la viabilidad de células de *C. albicans* en cultivos mixtos con distintas bacterias, algunos estudios han logrado cuantificar una drástica disminución en la viabilidad de la levadura al estar en presencia de bacterias, de

forma independiente, tales como *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. aeruginosa* (reduce de un 38 a 81% la viabilidad celular) *E. coli* o *S. mutans*, debido a una modulación negativa de estas bacterias al interactuar sobre la matriz de la biopelícula de la levadura (Thein y cols. 2006). De similar forma, el estudio de Rosario do palma y cols. (2018), evidenció una disminución significativa en las UFC de *C. albicans* en biopelículas mixtas junto a *S. mitis* y a *S. sanguinis*, en comparación a las UFC formadas de la levadura en biopelículas individuales.

Estos estudios están en concordancia con los resultados expuestos en el nuestro, el cual muestra una tendencia a disminuir las UFC de *C. albicans* al estar en cultivo mixto junto a *S. sanguinis* o *S. mutans*, en la mayoría de las condiciones experimentales y principalmente cuando se adiciona saliva, proveniente de individuos con caries activas, libres de caries o con historia de caries, respecto a la condición de las levaduras en monocultivo y sin saliva.

En relación a la saliva, en la actualidad se han detectado más de 1.000 proteínas en ella (el proteoma salival), aunque quizás solo el 10% de ellas están presentes en abundancia. Tan pronto como la superficie de un diente erupciona o se limpia, las proteínas salivales, como las glicoproteínas, se adsorben a la superficie del esmalte, formando la PSA (Hannig y cols., 2005). Esta película continúa desarrollándose con el tiempo y varía en grosor según la ubicación en la boca. Los componentes principales de esta película se derivan de la saliva e incluyen glicoproteínas, fosfoproteínas y lípidos; algunos ejemplos incluyen estaterina, amilasa, péptidos ricos en prolina, mucinas, lisozima, lactoperoxidasa y factores de defensa del hospedero (Lee y cols., 2013). También se han detectado componentes bacterianos, como glucosiltransferasas y glucanos, incluso ésta PSA también puede contener componentes del líquido crevicular gingival.

La composición molecular y las propiedades fisicoquímicas de la PSA son importantes porque influyen en el patrón de colonización microbiana. A medida que una célula bacteriana se acerca a la superficie del diente recubierta de película, se generan fuerzas fisicoquímicas de largo alcance, pero relativamente débiles, que pueden mantener a las bacterias orales cerca de la superficie. Esta interacción

puede hacerse más permanente si estas bacterias débilmente unidas poseen moléculas de superficie (adhesinas) que se unen a moléculas complementarias (receptores) en una película a través de interacciones fuertes y de corto alcance (Nobbs y cols., 2009).

Las bacterias del género *Streptococcus* pueden usar múltiples adhesinas expresadas en la superficie celular para unirse a superficies recubiertas de saliva; por ejemplo, *S. sanguinis* puede adherirse a través de interacciones de tipo lectina, hidrófobas y / o proteínas específicas (adhesinas) (Nobbs y cols., 2009). *S. mutans* tiene el antígeno I / II, B, P1 o Pac, los cuales interactúan con aglutininas salivales (Brady y cols., 2010). Y *S. gordonii* presenta una proteína que puede interactuar tanto con proteínas salivales como con *A. naeslundii* (coadhesión) (McNab y cols., 1996).

Debido a lo anterior es que resulta interesante utilizar la saliva como un adyuvante que fomente o no la formación de biopelículas de *C. albicans* en monocultivo o en cultivos mixtos con bacterias, principalmente del género *Streptococcus*, uno de los colonizadores tempranos sobre la PSA para formar biopelículas.

Es importante agregar que la saliva cumple funciones muy relevantes en la cavidad oral para mantener la salud, al bañar constantemente los dientes y la mucosa oral, funciona como una solución limpiadora, un lubricante, un tampón y un depósito de iones de calcio y fosfato, que son esenciales para la remineralización de las lesiones de caries iniciales (Prabhakar y cols., 2009).

Es probable que se formen lesiones de caries si es que se alteran algunas funciones salivales como la tasa de flujo salival, la capacidad tamponante, *clearence* salival y finalmente su composición. Es debido a lo anterior que resulta importante estudiar las diferencias que existen en saliva, y así prevenir que ciertas características o parámetros salivales influyan directamente en el riesgo cariogénico humano, lo que no se abarcó en este trabajo de investigación. Tomando en cuenta

la composición salival, es de gran interés analizar las diferencias existentes entre un individuo u otro, incluso entre personas con salud bucal.

Además, se han encontrado diferencias étnicas en la saliva, en cuanto a composición salival y a biomarcadores de enfermedades. El estudio de Cho y cols. (2017) identificaron hasta 226 proteínas salivales distintivas de población coreana, que difieren del conjunto de datos universal de proteínas de saliva humana, a su vez, se determinaron diferencias significativas en la distribución de genes en el proteoma salival coreano en comparación con el proteoma universal de saliva humana, lo cual apoya fuertemente la existencia de diferencias étnicas en las proteínas salivales de esta población.

En el estudio de Castro y cols. (2016) se describió que la concentración de proteínas, el perfil electroforético y la concentración de IgA salival difiere entre los adultos jóvenes sin experiencia de caries y aquellos con un alto número de lesiones de caries, incluso la concentración total de proteínas salivales fue mayor en el primer grupo mencionado. En la misma línea, en el estudio de Prabhakar y cols. (2009), observaron que la tasa de flujo salival está disminuida considerablemente en niños con caries activas al compararlos con niños libres de caries. Otros estudios concuerdan en que la caries dental es probablemente la consecuencia más común de la hiposalivación. En contraste a lo anterior algunos estudios han informado que no existe una correlación entre la tasa de secreción salival y la actividad de caries (Lenander-Lumikari y Loimaranta, 2000).

En el mismo estudio de Prabhakar y cols. (2009), el pH y la capacidad amortiguadora de la saliva también están ligeramente disminuidos en niños con caries activas en comparación a niños libres de caries. En cuanto a la proteína total salival y la capacidad antioxidante total de la saliva aumentaron significativamente en los niños con caries activas frente a los libres de caries, pero el calcio total salival disminuyó significativamente en los niños con caries activas. Pese a lo anterior, el estudio concluye, al igual que otros, que el pH y la capacidad amortiguadora tienen una correlación débil con la actividad de caries ya que pueden ser otros factores

como el microbioma, la dieta y la retención de alimentos quienes podrían haber dominado la capacidad amortiguadora para iniciar la caries, que como se ha mencionado es una enfermedad multifactorial (Pitts y cols., 2017).

En cuanto a nuestro estudio, se observó una tendencia a disminuir las UFC de *C. albicans* en la mayoría de las condiciones experimentales cuando se adiciona saliva comparada a la ausencia de ésta. Debido a que la saliva contiene agentes antimicrobianos como las inmunoglobulinas, es de esperarse que, al adicionar saliva en las biopelículas estudiadas, disminuyeran los recuentos de células viables de *C. albicans*, pero que quizás promovió la filamentación de aquellas células que permanecieron viables, con la consecuente formación de biopelículas de parte de ésta. Sin embargo, a pesar de que se observó una diferencia en las UFC de las cepas de levadura en las condiciones experimentales al añadir saliva proveniente de individuos con caries activas o libres de caries o con historia de caries, debido al bajo número de réplicas biológicas que realizamos no es posible tener resultados concluyentes.

En consecuencia de lo anterior, podemos especular que el aumento en la formación de biopelículas de *C. albicans* en presencia de *S. sanguinis* o *S. mutans* cuantificada por la absorbancia, puede deberse principalmente al aumento de la biomasa por células de levaduras filamentadas y/o más bien a un aumento de la cantidad de bacterias y no de levaduras, debido a que el recuento de UFC de *C. albicans* fue menor en estas biopelículas mixtas en comparación a las biopelículas de los aislados clínicos individualmente.

Sin duda, otro parámetro considerable de medir es la capacidad de filamentación de los aislados clínicos de *C. albicans* al estar en cultivo mixto con bacterias, debido a que uno de los factores de virulencia más relevantes de la levadura es su transición morfológica del estado levaduriforme a la producción de hifas, lo que le permite adherirse a distintas superficies y formar biopelículas. La condición filamentosa de esta levadura se ha tornado un aspecto de importancia clínica cuando este microorganismo invade tejidos en una condición sistémica y en presencia de *S. mutans* en una condición cariogénica, lo que se ha considerado dañino para el hospedero.

Estudios previos han demostrado la capacidad de filamentación de *C. albicans* al estar en presencia de bacterias orales, incluido *S. sanguinis*. Por ejemplo, el estudio de Rosario do Palma y cols. (2018), determinó la capacidad de filamentación de esta levadura al interactuar con *S. mitis* y *S. sanguinis* respecto a la filamentación control de *C. albicans* en monocultivo. Los resultados obtenidos describen que la interacción con *S. mitis* fue capaz de inhibir la filamentación de *C. albicans* ya que hubo una diferencia significativa en comparación al control y, por otro lado, en cultivo mixto con *S. sanguinis*, la bacteria no fue capaz de inhibir la filamentación, por lo que la levadura presentó una filamentación similar a la condición de monocultivo. Lo descrito anteriormente coincide con nuestros resultados de determinar la capacidad de filamentación de los aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de cada una de las bacterias utilizadas en este estudio. Sin embargo, se observó un aumento en la filamentación de las levaduras en presencia de cada una de las bacterias estudiadas y/o de suero, en comparación al control monocultivo sin suero. Cabe destacar que se obtuvo una diferencia significativa en la filamentación de la cepa de levadura P1-1 en co-cultivo con *S. mutans* en presencia de suero, respecto a esta misma cepa de levadura en monocultivo con y sin suero o junto a *S. sanguinis* y a la cepa P25-4 en todas las condiciones experimentales, excepto junto a *S. mutans* (Figura 9). Resultado esperable debido a la procedencia de esta cepa de levadura (proveniente de saliva de individuos con caries activas, ICDAS 5-6), la cual está adaptada a coexistir con bacterias acidogénicas como lo es *S. mutans*.

Finalmente, estudiar el papel que desempeña el H_2O_2 resulta relevante ya que éste compuesto cumple un importante rol en la etapa de formación inicial de las biopelículas orales, como antimicrobiano y generador de competencia bacteriana para obtener una biopelícula temprana compuesta por especies que sobreviven a la presencia de este compuesto (Zhu y Kreth, 2012). Por ejemplo, se ha descrito que actúa como compuesto antimicrobiano, interfiriendo con la colonización de *S. mutans* sobre los dientes (Kreth y cols., 2008).

Según el estudio de Carlsson y cols. (1983), *S. sanguinis* produce H_2O_2 mediante la enzima piruvato oxidasa (SpxB), que en condiciones aerobias produce un total de 66 ± 9 nM/mg/min y en condiciones anaerobias 9 ± 3 nM/mg/min.

En el estudio de Kreth y cols. (2008) se describieron concentraciones producidas por *S. sanguinis* en aerobiosis alrededor de $400 \mu M$ en 300 min y un poco más de $300 \mu M$ de H_2O_2 en 540 min, en ausencia y presencia de glucosa, respectivamente.

Existen estudios que describen el efecto del H_2O_2 en *C. albicans*, por ejemplo, el estudio de Jan y cols. (2019), menciona cómo las especies de *Lactobacillus*, presentes predominantemente en la microbiota del tracto vaginal de mujeres sanas, ayudan a prevenir la infección por patógenos como el sobrecrecimiento de levaduras *Candida*, al producir ácido láctico, H_2O_2 y otros compuestos antimicrobianos.

En cuanto a nuestro estudio, logramos determinar el efecto del H_2O_2 sobre los aislados clínicos orales de *C. albicans*, obteniendo una concentración inhibitoria mínima de un valor menor a $0,0075$ mM de H_2O_2 para ambas cepas de levadura estudiadas (P1-1 y P25-4).

A pesar del efecto que el H_2O_2 tiene sobre *Candida*, esta levadura tiene mecanismos de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha descrito que los macrófagos u otras células fagocitarias, se enfrentan a *C. albicans* cuando ésta produce una infección sistémica, estas células son capaces de fagocitar y matar microorganismos y secretan una variedad de factores solubles, incluidas citoquinas y quimioquinas, y también metabolitos oxidativos mediante dos sistemas antimicrobianos que son responsables de la generación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Pese a lo anterior, *C. albicans* posee factores de virulencia que incluyen la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares, inhibidores del complemento, moléculas de reconocimiento de superficie que evitan que el hongo sea reconocido por el hospedero y cambios

fenotípicos que hacen que las células de levaduras sean “invisibles” para los neutrófilos (Höfs y cols. 2016). Estos factores de virulencia permiten que *C. albicans* evada la respuesta inmune del hospedero. Además, se ha reportado que especies de *Candida*, como *C. albicans* y *C. dubliniensis* tienen mecanismos de resistencia al estrés oxidativo utilizando enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la cual juega un importante rol protector contra el ataque de macrófagos y neutrófilos, los cuales generan radicales superóxido (Vásquez y cols., 1998). La SOD convierte los dañinos radicales superóxido (O_2^-), un tipo de ROS, en H_2O_2 que es menos dañino, el cual puede convertirse en agua (H_2O) y en oxígeno (O_2) mediante la acción de la enzima catalasa (Martchenko y cols., 2004). Las enzimas antioxidantes SOD y catalasa pueden actuar sinérgicamente para proteger a las células fúngicas del daño oxidativo. Algunos autores han sugerido que la inactivación coordinada de ROS mediante la acción secuencial de enzimas inactivadoras de superóxido y peróxido de hidrógeno es esencial para la protección eficaz de las células frente a la toxicidad de ROS (Lortz y Tiedge, 2003).

Resulta interesante agregar acerca de las moléculas *quorum sensing* que sintetizan las células bacterianas que forman la biopelícula y, que se difunden de unas a otras como señales de comunicación. La síntesis de estas moléculas aumenta a medida que se incrementa la densidad celular y, a un determinado umbral, interaccionan con sus receptores provocando la expresión de genes específicos. El circuito *quorum sensing* coordina una gran variedad de funciones fisiológicas, interviniendo en la inducción y formación de biopelículas maduras (Del pozo y Cantón, 2016).

Por otro lado, Tiroso y Farnesol, moléculas *quorum sensing* presentes en levaduras, actúan de diferente forma; el tiroso favorece la formación de la biopelícula en las etapas iniciales e intermedias del desarrollo, mientras que el farnesol evita el desarrollo excesivo de la misma (Del pozo y Cantón, 2016). En esta misma línea, el estudio de Sebaa y cols. (2019) examinaron los efectos de las moléculas de *quorum sensing* mencionadas anteriormente en el desarrollo de la biopelícula de *C. albicans* con el fin de dilucidar su función como nuevos adyuvantes

en la higiene bucal y lo hicieron de manera muy similar a nuestro estudio. La investigación se realizó en *C. albicans* ATCC 10231 y en aislados clínicos de esta levadura proveniente de prótesis dentales. El crecimiento de la levadura y su capacidad para formar biopelículas se evaluó después de incubaciones de 24 y 48 h a 37°C en caldo Sabouraud suplementado con 0,001-3 mM de farnesol y/o 1-20 mM de tirosol. El crecimiento de la levadura se evaluó mediante turbidimetría y las biopelículas se cuantificaron mediante tinción con cristal violeta, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Por otro lado, para medir la viabilidad de las células fúngicas se realizó el cultivo de células planctónicas y se examinaron las biopelículas usando microscopía de fluorescencia. A una concentración de 3 mM de farnesol se observó la mayor inhibición de formación de biopelícula (> 50% de inhibición) cuando éste se añadió al comienzo del ensayo comparado cuando se añadió en biopelículas preformadas (<10% de inhibición). De manera similar, el tirosol a 20 mM tuvo un efecto mayor cuando recién se estaban formando las biopelículas (inhibición>80%) que sobre biopelículas preformadas (<40% de inhibición). A pesar de las reducciones significativas en la biomasa adherida, en presencia de las moléculas investigadas, no se observó gran variación en el crecimiento de las levaduras, como lo corrobora la turbidimetría, recuento de UFC/mL y las pruebas de viabilidad. Por lo tanto, a las concentraciones más altas ensayadas, las moléculas tuvieron un mayor efecto durante las fases iniciales de formación de biopelículas. Adicionalmente, el efecto del farnesol durante la anaerobiosis no fue significativamente diferente del observado durante la aerobiosis, a diferencia del tirosol durante la anaerobiosis, que mostró una inhibición de la biopelícula de levadura ligeramente reducida. Finalmente, el estudio demostró el efecto anti-biopelícula específico, independiente de la acción fungicida o fungistática, del farnesol y el tirosol sobre *C. albicans*.

Las interacciones microbianas influyen directamente para que un microbioma oral que se encuentra en un estado de equilibrio o salud pase a un desequilibrio patológico, por lo que estudiar el papel que cumple cada microorganismo participante de una biopelícula dental resulta relevante. *C. albicans* es una levadura participante de las biopelículas orales y una de las que más fomenta la formación

de éstas, pero dependiendo de variados factores ambientales, nutricionales o físicos, esta levadura influirá promoviendo un estado de salud oral como comensal o interactuando hacia el desarrollo de una enfermedad oral como patobionte, lo cual no se ha dilucidado aún con certeza.

8. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de este trabajo de investigación son una prueba de concepto, preliminares y descriptivos que podrían dar cuenta del complejo escenario presente en la estructura y función de las biopelículas orales. Teniendo esto en consideración, podemos concluir:

Los aislados clínicos orales de *C. albicans* presentan la capacidad de formar biopelículas en presencia de bacterias, tales como *S. sanguinis* o *S. mutans* y al parecer, tanto el origen de la saliva como de la cepa de levadura podrían estar modulando el desarrollo de éstas. No así con respecto a la viabilidad de las levaduras en donde al parecer resulta relevante el origen de la saliva.

A su vez, el origen de las cepas de *C. albicans* y las bacterias estudiadas determinan la capacidad de filamentación de la levadura.

Finalmente, el H₂O₂ tendría un efecto como compuesto antimicrobiano en los aislados clínicos orales de *C. albicans*. Sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer las vías metabólicas y los mecanismos celulares implicados en la inhibición del crecimiento de la levadura, así como las repercusiones en el microbioma oral.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Bakri AG, Othman G, Bustanji Y (2009). The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 280-286.
- Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF (2010). The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Molecular Microbiology*, 77: 276–286.
- Carlsson J, Iwami Y, Yamada T (1983). Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infection and Immunity*, 40:70–80.
- Castro RJ, Herrera R y Giacaman RA (2016). Salivary protein characteristics from saliva of carious lesion-free and high caries adults. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 29 (2): 178-185.
- Chen HF y Lan CY (2015). Role of SFP1 in the regulation of *Candida albicans* biofilm formation. *PLoS ONE* 10 (6): e0129903.
- Cho HR, Kim HS, Park JS, Park SC, Kim KP, Wood TD, Choi YS (2017) Construction and characterization of the Korean whole saliva proteome to determine ethnic differences in human saliva proteome. *PLoS One*, 12 (7): e0181765.
- Coronado-Castellote L y Jiménez-Soriano Y (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5 (5): 279-286.
- Del Pozo JL y Cantón E (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183.
- Djais AA, Jemmy, Putri N, Rahmania Putri A, Angky Soekanto S. (2020) Description of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* biofilms after exposure to propolis dentifrice by using OpenCFU method. *Saudi Dentistry Journal*, 32(3):129-134.
- do Rosário Palma AL, Domingues N, Pimentel de Barros P, Back Brito GN y Cardoso Jorge AO (2018). Influence of *Streptococcus mitis* and

Streptococcus sanguinis on virulence of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies. *Revista microbiológica*, 64 (2): 215–222.

- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH y Koo H (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes the virulence of plaque-biofilms in vivo. *Infection and Immunity*, 82:1968–81.
- Fragkou S, Balasouli C, Tsuzukibashi O, Argyropoulou A, Menexes G, Kotsanos N y Kalfas S (2016). *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children. *European Archives Paediatric Dentistry*, 17 (5): 367-375
- Giacaman RA (2017). Sugars and beyond. The role of sugars and other nutrients and their potential impact on caries. *Journal Oral Diseases*, 24: 1185-1197.
- Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM y Mira A (2018). Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. *PLoS One*, 13 (6): e0198021.
- Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ y Griffen AL (2012). Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*, 7(10): e47722.
- Hannig C, Hannig M, Attin T (2005). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Europe Journal Oral Scientific*, 113: 2–13
- Höfs S, Mogavero S y Hube B (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal Microbiology*. 54, 149–169.
- Hummel R, Akveld NAE, Bruers JJM, van der Sanden WJM, Su N y van der Heijden GJMG (2019). Caries Progression Rates Revisited: A Systematic Review. *Journal of Dental Research*, 98 (7): 746–754.
- Jang SJ, Lee K, Kwon B, You HJ y Ko G. (2019). Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Scientific reports*, 9(1), 8121.

- Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC. (2009). *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*, 8:1658–64
- Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari D, Murray CJ y Marcenes W (2015). Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of Dental Research*, 94: 650-658.
- Kreth J, Giacaman RA, Raghavan R y Merritt J (2017). The road less traveled defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Molecular Oral Microbiology*, 32 (3): 181-196.
- Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 190(13):4632-40.
- Kreth J, Vu H, Zhang Y y Herzberg MC (2009). Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of bacteriology*, 191 (20): 6281-6291.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, and Qi F (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187 (21): 7193–7203.
- Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL (2013). Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS ONE*, 8: e67919
- Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. (2000). Saliva and dental caries. *Advances in dental Research*, 14:40-47.
- Li W, Dongsheng Y, Shuo G, Jiacheng L, Zhuoyu C y Wei Z (2014). Role of *Candida albicans*-secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 10766–10779.
- Lortz S, Tiedge M (2003). Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 34:683-688.
- Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC y Urzúa Orellana BR (2017). Prevalence of *Candida albicans* and

carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontologica Scandinavica*, 75 (1): 30-35.

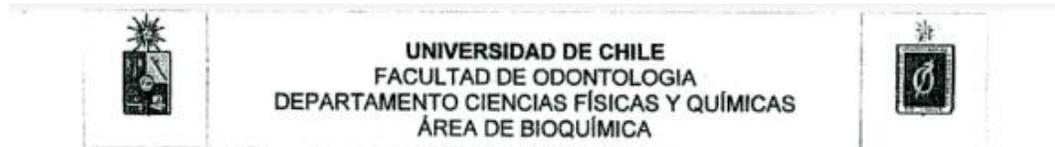
- McNab R, Holmes AR, Clarke JM, Tannock GW, Jenkinson HF (1996). Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infection and Immunity*, 64: 4204–4210
- Mandel ID (1987). The functions of saliva. *Journal Dental Research*, 66:623-627.
- Marsh PD y Zaura E (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 (18): 12–22.
- Marsh PD, Do T, Beighton D y Devine DA (2015). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70: 80-92.
- Martchenko M, Alarco A, Harcus D, Whiteway M (2004). Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced SOD5 Gene. *Molecular Biology of the Cell*, 15:456-467.
- Merritt JH, Kadouri DE y O'Toole GA (2005). Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 1: Unit1B.1.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP (2013). *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathogens*, 9: e1003616.
- Moynihan PJ y Kelly SA (2014). Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. *Journal of Dental Research*, 93: 8-18.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73: 407–450.
- Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW y Shirtliff ME (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* –*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59 (3): 493–503.

- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A (2017). Dental caries. Nature review disease primers, 25;3:17030.
- Prabhakar AR, Reshma D y Raju OS (2009). Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children—An In Vivo Study. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2 (1): 9-12.
- Redanz S, Cheng X, Giacaman RA, Pfeifer CS, Merritt J y Kreth J (2018). Live and let die: hydrogen peroxide production by the commensal flora and its role in maintaining a symbiotic microbiome. Molecular Oral Microbiology, 33 (5): 337-352.
- Redanz S, Treerat P, Mu R, Redanz U, Zou Z, Koley D, Merritt J, Kreth J (2020). Pyruvate secretion by oral streptococci modulates hydrogen peroxide dependent antagonism. The ISME Journal,14:1074–1088.
- Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC y Jorge AOC (2016). *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. Journal of Applied Microbiology, 122: 201-211.
- Rudney JD, Jagtap PD, Reilly CS, Chen R, Markowski TW, Higgins L, Johnson JE y Griffin TJ (2015). Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. Microbiome, 3: 69.
- Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 44 (18): 5-11.
- Sebaa S, Boucherit-Otmani Z, Courtois P (2019) Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. Molecular Medicine Reports, 19(4):3201-3209.

- Simón-Soro A, Guillen-Navarro M y Mira A (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 98 (7): 746–754.
- Sheiham A y James WP (2015). Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *Journal of Dental Research*, 94: 1341-1347.
- Takahashi N. (2015). Oral microbiome metabolism: from “who are they?” to “what are they doing?”. *Journal of Dental Research*, 94: 1628-1637.
- Takahashi N y Nyvad B (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 90: 294-303.
- Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51 (8): 672-680.
- Vázquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA (1998). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 66:145-150.
- Wade WG (2012). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69: 137-143.
- Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP (2016). *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathogens and Disease*, 74 (5): 39.
- Yang C, Scoffield J, Wu R, Deivanayagam C, Zou J, Wu H (2018). Antigen I/II mediates interactions between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Molecular Oral Microbiology*, 33:283–291.
- Zhu L y Kreth J (2012). The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012: 717843.
- Zhu B, Macleod LC, Kitten T y Xu P (2018). *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiology*, 13(8): 915-923.

10. ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo 1: Consentimiento informado



Fecha Edición: 24 de Octubre de 2011

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo Carla Lozano Moraga, docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, estoy realizando una investigación relacionada con microorganismos, los cuales son frecuentes en la población, especialmente en aquella que presenta caries dental. Le proporcionaré información y lo(a) invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de hacerlo puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario. Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Nombre del proyecto, Investigadores asociados al Proyecto, Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Procedimiento, Ventajas y Eventuales Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.

NOMBRE DEL PROYECTO: "Efecto de factores de virulencia de *Lactobacillus casei* y *Candida albicans* sobre parámetros de crecimiento y viabilidad celular de *Streptococcus sanguinis*: un colonizador temprano del biofilm dental en ausencia de caries".

INVESTIGADORES ASOCIADOS: En este estudio el **Investigador Responsable** es: la Dra. Carla Lozano Moraga y el **Investigador Patrocinante** es el Dr. Víctor Cifuentes Guzmán. El Cirujano-Dentista, Dr. Gonzalo Rodríguez, perteneciente al área de Cariología de la Facultad de Odontología, es quien oficiará como único colaborador de este proyecto. El Financiamiento del estudio será por el Proyecto FONDECYT Postdoctorado 2012.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN: La caries dental es una enfermedad definida como infecciosa, que se puede transmitir y se origina por varios factores. Entre los factores implicados se pueden mencionar el alto consumo de azúcares, hábitos de higiene, acción de la saliva, tipo y cantidad de microorganismos presentes en la boca, entre otros. Debido a los factores anteriormente mencionados, la armonía que existe entre los microorganismos en estado de salud bucal, se altera, favoreciendo el desarrollo de aquellos que están involucrados tanto en la aparición como en el desarrollo de la caries dental. Las relaciones entre los distintos microorganismos que conviven, tanto en condiciones de salud como en presencia de caries, aún no se han aclarado del todo con exactitud, existiendo todavía un vacío en este tema.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN: Esta investigación tiene por objetivo detectar la presencia, cantidad y tipos de bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus* y de levaduras del género *Candida* en la saliva de niños sanos y en niños con caries. Además, se evaluará el efecto de las toxinas de la bacteria *Lactobacillus casei* y de la levadura *Candida albicans* sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus sanguinis*. El estudio incluirá a un número total de 60 niños (30 sanos y 30 con caries), de 2 a 5 años de edad, que son atendidos en el servicio de diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

PROCEDIMIENTO AL QUE SERÁN SOMETIDOS LOS VOLUNTARIOS: Si usted acepta que su hijo/a participe, él/ella será examinado(a) por el Dr. Gonzalo Rodríguez. A su hijo(a) o pupilo, se le tomará una muestra de saliva, la cual deberá ser depositada dentro de un frasquito que nosotros le proporcionaremos. En caso que ustedes estén dispuestos a participar pero el niño no sea capaz de depositar la saliva al frasquito, nosotros lo podemos ayudar con una bombilla plástica llamada pipeta.



Antes del examen, a su hijo(a) o pupilo se le dará una breve explicación del procedimiento a realizar por parte del Dr. Rodríguez.

VENTAJAS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: Su hijo(a) o pupilo tendrá el beneficio de conocer el estado actual de su boca. Además, ellos y Usted recibirán al comienzo del estudio, una charla acerca de cómo cuidar y mantener la limpieza de sus dientes.

EVENTUALES RIESGOS DE LA INVESTIGACIÓN: Su hijo(a) o pupilo **NO CORRERÁ NINGÚN RIESGO** durante o posteriormente a su participación.

Toda la información derivada de su participación en este estudio, será conservada con estricta confidencialidad. Las únicas personas que tendrán acceso a los datos serán los investigadores de este estudio. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Cabe destacar que los datos personales serán codificados, es decir, se les asignará un número. Bajo ninguna circunstancia la Investigadora Responsable o el Investigador Patrocinante o el Cirujano-Dentista divulgarán estos antecedentes. Sólo se trabajará con el código asignado. Tampoco se le tomarán fotografías ni videos.

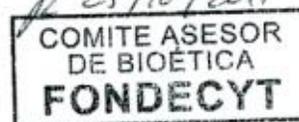
ACLARACIONES:

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para su hijo(a) o pupilo, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide puede retirar del estudio a su hijo(a) o pupilo cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por la participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable, y posteriormente, las conclusiones del estudio, serán compartidas con usted si lo desea.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará su nombre sino un sistema de código que enumerará las muestras.
- Se le entregará a Usted una copia de este documento de Consentimiento Informado.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento, y de haber podido aclarar todas sus dudas, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado de la Investigación mencionada.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

- 1.- Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para que un(a) Cirujano-Dentista, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, me entreviste a mí y a mi hijo(a) y examine la boca de mi hijo(a). Estos procedimientos durarán alrededor de 30 a 50 minutos.
- 2.- Comprendo que los datos obtenidos en estos procedimientos, serán utilizados en un estudio de la U. de Chile, diseñado para averiguar la razón por la cual nos enfermamos de caries. Entiendo que este estudio tiene como finalidad última el contribuir con información para mejorar la salud bucal, el diagnóstico y prevención de la caries dental y sus resultados serán publicados en revistas científicas.
- 3.- Entiendo además, que para realizar parte de esta investigación mi hijo(a), deberá donar una muestra de saliva equivalente al volumen de una cuchara de té (5 ml), a la cual se le realizarán estudios de laboratorio. Entiendo que la muestra de saliva obtenida de la boca de mi hijo(a) será utilizada sólo para este estudio.
- 4.- Declaro que mi participación y la de mi hijo(a) en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo deseemos. Si esto último ocurre, no habrá consecuencias negativas



- sobre la atención que reciba el niño(a). Entiendo además, que la obtención de saliva de la boca del niño y el examen clínico que se le practicará, no presenta riesgo alguno. Sé que la información obtenida de mi hijo/a o pupilo será tratada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación, sin fines de lucro. Entiendo que nuestros nombres y nuestros datos personales no serán jamás identificados públicamente.
- 5.- Por nuestra condición de voluntarios, entiendo que yo ni mi hijo(a) o pupilo recibiremos ninguna retribución económica. Comprendo que nuestra participación en este estudio no obliga de manera alguna a la Facultad de Odontología, de la Universidad de Chile, o al investigador, a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades de la boca de mi hijo(a) o pupilo. Sin embargo, también he sido informado que si mi hijo(a) o pupilo presenta alguna enfermedad en la boca, será derivado al especialista respectivo.
- 6.- Entiendo sí, que por el hecho de participar en el estudio, yo y mi hijo(a) tenemos derecho a que se nos informe sobre los resultados de los exámenes que se practicará y a recibir un consejo al respecto, de parte del Cirujano-Dentista que examinó a mi hijo(a) o pupilo.
- 7.- El resultado final de la investigación me deberá ser entregado a mí, en representación de mi hijo(a), por escrito, con la correspondiente interpretación, si así lo deseo. Si requiero cualquier aclaración o información adicional sobre este estudio y nuestra participación en él, debo dirigirme al Dr. Gonzalo Rodríguez, Fono 02-9781742 o celular 95426731; al Investigador Responsable, Dra. Caría Lozano, Fono 02-9781792 o celular 93192730 o al Comité de Ética de la Facultad de Odontología, representado por el Dr. Juan Cortés, Fono 9781703. Las tres personas mencionadas se ubican en Av. Sergio Livingstone N° 943, Independencia, Santiago.
- 8.- Se me ha explicado que los datos clínicos y los resultados de los análisis de laboratorio permanecerán guardados en una base de datos y a ella tendrán acceso sólo el Investigador Responsable y el Dr. Rodríguez, quien examinará a los niños.

			
Firma del voluntario (Padre/Apoderado/Tutor)		Firma del Cirujano-Dentista	
Nombre: <u>V.</u>		Nombre: <u>Gonzalo Rodríguez M.</u>	
Solicita Informe: Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			

<u>Carla Lozano</u>
Firma del Investigador Principal
Nombre: <u>Carla Lozano M.</u>

Fecha: Santiago, 24 de Mayo de 20 12

25/10/2011
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

