



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

Producción de autoinductor-2 por *Lactobacillus salivarius* SC18 y sus efectos en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas.

Joel Jeran Sánchez Vargas

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

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dra. Carla Lozano Moraga
Dra. Naomi Riquelme Vergara

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/002

Santiago – Chile

2020



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

Producción de autoinductor-2 por *Lactobacillus salivarius* SC18 y sus efectos en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas.

Joel Jeran Sánchez Vargas

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dra. Carla Lozano Moraga
Dra. Naomi Riquelme Vergara**

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/002

Santiago – Chile

2020

A mis padres Hector y María Francisca por su apoyo incondicional.

A mi hermano, familia y amig@s por creer siempre en mí.

A mi novia Constanza por su amor, empatía y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecer a mis padres, Héctor y María Francisca, gracias por el apoyo y amor que nos han brindado a mi hermano y a mí a lo largo de nuestra vida, por enseñarnos a ser mejores personas y a nunca rendirnos, porque si tengo fortaleza para enfrentar todos los problemas es gracias a ustedes, los amo infinitamente, y quiero que sepan que siempre podrán contar con su hijo Joel para lo que sea, nunca los dejaré solos.

A mi hermano Joan, porque a pesar de nuestras diferencias, siempre has creído en mí y en mis capacidades, gracias por preocuparte tanto por mis padres. Recuerda que siempre contarás conmigo cuando necesites cualquier cosa, te amo.

A mi novia Constanza. Faltan palabras para expresar lo agradecido que estoy de tenerte a mi lado, gracias por ser mi confidente y apoyo incondicional en los peores momentos. Ha sido un año muy difícil, pero gracias a nuestro amor hemos sobrellevado todos los obstáculos sin problema. Eres a quien quiero tener a mi lado por siempre, no cambies nunca, te amo demasiado.

A mis suegros Angelina, Eduardo y a mi cuñado Antonio, gracias por quererme, apoyarme y confiar en mí desde el primer día, son una gran familia y estoy muy feliz de que ahora sean parte de la mía también, los quiero mucho.

A mis primas, abuela y tías, gracias por siempre hacerme creer que yo podía con todos los obstáculos, siempre confiaron en mis capacidades y me entregaron mucho amor, las quiero mucho.

A mis y amig@s Juan, Matías, Felipe, Benjamín, Luis, Karen y Valentina, gracias por los buenos momentos, por la ayuda emocional, por creer en mis capacidades, son grandes personas que llevaré siempre en mi corazón.

A Johanny, mi partner, mi compañero de risas, penas, rabias y nervios en la universidad, gracias por todo el cariño, la paciencia y el apañe que me has entregado, no cambies nunca, sigue siendo la persona noble, simpática y cariñosa que te caracteriza, te quiero mucho amigazo.

A mi gran amigo Gustavo, amigo de infancia que aún sigue apoyándome, ayudándome y queriéndome, gracias por todo, tu sabes que te debo demasiado, y que me faltará vida para agradecerte lo que hiciste por mi padre, siempre cuenta conmigo para lo que sea.

A la profesora Claudia Lefimil, gracias por su ayuda, aprendí demasiado de todo lo que me enseñó. Antes de trabajar con usted yo era un desastre y gracias a sus consejos y tareas he podido ordenar mi cabeza y hoy puedo decir que soy mucho más productivo y ordenado que antes. Es una persona muy sabia y empática, por eso todo el alumnado la estima tanto, incluyéndome. Espero poder seguir trabajando en sus proyectos y seguir nutriéndome de su experiencia.

Al laboratorio de Bioquímica y biología oral y a mis tutoras asociadas, gracias por la buena disposición y buena onda que irradian en su lugar de trabajo.

Finalmente quería expresar el orgullo que siento en este momento, por todo el esfuerzo, garra y perseverancia que puse para llegar a donde estoy ahora, y estoy seguro de que será el primero de muchos logros en el ámbito profesional que se vendrán a futuro, nuevamente gracias a todos.

INDICE.

INDICE.....	1
RESUMEN.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Enfermedad de caries y biopelícula dental.	4
1.2. <i>Lactobacillus</i> spp.	7
1.3. <i>Lactobacillus salivarius</i>.	8
1.4. <i>Quorum Sensing</i>.	8
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVO GENERAL.....	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
5. METODOLOGIA.....	14
5.1. Cultivos microbiológicos.	14
5.2. Detección de AI-2 producido por <i>L. salivarius</i> SC18.	14
5.3. Análisis del efecto de AI-2 en el crecimiento de <i>L. salivarius</i> SC18. 15	
5.4. Análisis del efecto de AI-2 en la adherencia bacteriana de <i>L. salivarius</i> SC18.	16
5.5. Análisis del efecto de AI-2 en la formación de biopelículas de <i>L. salivarius</i> SC18.	16
5.6. Análisis estadísticos.	17
6. RESULTADOS.....	18
6.1. Crecimiento y producción de AI-2 de <i>L. salivarius</i> SC18.	18
6.2. Efecto de AI-2 en el crecimiento de <i>L. salivarius</i> SC18.	20
6.3. Efecto de AI-2 en la adhesión de <i>L. salivarius</i> SC18.	21
6.4. Efecto de AI-2 sobre la formación de biopelículas de <i>L. salivarius</i> SC18.	22
7. DISCUSIÓN.....	24
7.1. Producción de AI-2 por <i>L. salivarius</i> SC18.	24
7.2. Efecto de AI-2 sobre el crecimiento de <i>L. salivarius</i> SC18.	25
7.3. Efecto de AI-2 sobre la adhesión de <i>L. salivarius</i> SC18.	26
7.4. Efecto de AI-2 sobre la formación de biopelículas de <i>L. salivarius</i> SC18. 27	
8. CONCLUSIONES.....	29
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
10. ANEXOS.....	37

RESUMEN.

Introducción. La caries dental es una enfermedad multifactorial. Uno de los factores corresponde a una biopelícula bacteriana que, producto del metabolismo de carbohidratos fermentables, genera un ambiente ácido en la superficie dentaria, que si se mantiene en el tiempo es capaz de desmineralizarla. Dentro de las especies aisladas y asociadas a lesiones de caries se encuentran bacterias del género *Lactobacillus*, entre ellas *Lactobacillus salivarius*. Los microorganismos interactúan mediante mecanismos de comunicación intercelular tales como *quorum sensing* (QS), que consiste en la producción y detección de moléculas difusibles denominadas autoinductores, entre ellas autoinductor-2 (AI-2). Esta molécula regula procesos como la adhesión y formación de biopelículas, y se ha descrito en variadas especies bacterianas, sin embargo, en *Lactobacillus* spp. orales está muy poco reportado.

Objetivo. Determinar la funcionalidad del sistema *quorum sensing* LuxS y su participación en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas en *Lactobacillus salivarius* SC18.

Metodología. Se utilizó la cepa *L. salivarius* SC18, proveniente de saliva de un individuo con lesiones de caries. Se analizó la presencia y funcionalidad de AI-2 producido por *L. salivarius* mediante bioensayo reportero *Vibrio harveyi* BB170. Para el ensayo de crecimiento se cultivó *L. salivarius*, midiendo su densidad óptica cada 30 minutos. Se estudió la adherencia de *L. salivarius* mediante el ensayo MTT (Sigma®). Para análisis de formación de biopelículas estas fueron teñidas con cristal violeta. Los tres ensayos fueron analizados en presencia y ausencia de AI-2 sintetizado químicamente a diferentes concentraciones.

Resultados. No fue posible detectar la presencia de AI-2 en los cultivos de *L. salivarius*. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los ensayos de crecimiento, adhesión y formación de biopelículas en presencia y ausencia de AI-2.

Conclusiones. *L. salivarius* SC18 no posee un sistema QS funcional mediado por AI-2 y el crecimiento, la capacidad de adhesión y de formación de biopelículas de *L. salivarius* son independientes de los niveles de AI-2 presentes en el medio. Estos antecedentes permiten inferir que *L. salivarius* SC18 tiene ventajas competitivas y evolutivas que le favorecerían a la hora de colonizar sitios de la cavidad oral.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Enfermedad de caries y biopelícula dental.

La caries dental corresponde a una enfermedad dinámica y multifactorial, que afecta a gran parte de la población mundial. Se ha descrito que el 90% de la población infantil presenta esta enfermedad y la caries no tratada en la dentición permanente corresponde a la afección de salud más común a nivel mundial (Peres y cols., 2019).

En Chile, la prevalencia de la enfermedad de caries va desde 16,8% a los 2 años de edad hasta casi el 100% en la población adulta. En dentición temporal, según el índice ceod (dientes cariados, obturados y extraídos por caries) la severidad de esta patología es de 0,5 a los 2 años; 2,3 a los 4 años y 3,7 a los 6 años (MINSAL, 2017). Por otro lado, en dentición permanente, el índice COPD (dientes cariados, obturados y perdidos por caries) es de 0,13 a los 6 años y 1,9 a los 12 años, aumentando significativamente hasta 15,1 en adultos de 35-44 años y 21,57 en adultos de 65 a 74 años (MINSAL, 2017).

Se ha descrito que esta patología es generada por la interacción entre la superficie dentaria, una biopelícula microbiana, azúcares y factores propios del hospedero (saliva y genética) (Pitts y cols., 2017). La biopelícula microbiana, o biopelícula dental, corresponde a una mezcla de microorganismos, biopolímeros microbianos, glicoproteínas salivales y otras moléculas hospedantes. Su formación comienza con la adhesión de bacterias, principalmente Gram positivo, a la película salival adquirida, la cual es una delgada capa de constituyentes salivales que se adsorben rápida y selectivamente sobre la superficie del esmalte. El crecimiento de estas primeras bacterias adheridas conforma una biopelícula de enlace, en la cual se facilita la adhesión de otras bacterias, permitiendo la biodiversidad en la biopelícula dental. Además, las bacterias que se unirán estarán condicionadas por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno u otros componentes, lo que genera una amplia diversidad de especies dependiendo de la superficie dentaria que se esté colonizando (Jenkinson, 2011).

El proceso de generación de lesiones caries es dinámico, con períodos alternados de desmineralización y remineralización en la superficie dentaria, relacionados con fluctuaciones de pH en la biopelícula. Si el pH de la biopelícula desciende por debajo del umbral crítico de desmineralización (pH 5,5) durante un período sostenido, el resultado es la desmineralización progresiva y la pérdida sostenida de calcio y fosfato de la sustancia mineral del diente. Esta disminución en el pH se produce debido a la presencia de bacterias acidogénicas (capaces de producir ácidos) y acidúricas (capaces de sobrevivir en un ambiente ácido y seguir produciendo ácido) en la biopelícula dental, las que producen ácidos orgánicos como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta (Aas y cols., 2008; Takahashi & Nyvad, 2011; Caufield y cols., 2015). En las primeras etapas (subclínicas), se pierde suficiente mineral para que la lesión aparezca clínicamente como una mancha blanca en la superficie del diente. Si la lesión de caries progresa conduce a la cavitación, y si se extiende a la pulpa dental puede causar infección y, en última instancia, sepsis y pérdida de dientes (Peres y cols., 2019).

Se han desarrollado tres hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la enfermedad de caries:

a) Hipótesis de la placa específica (Loesche, 1992):

Solo algunas especies patógenas están involucradas en la enfermedad de caries, tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Inicialmente se identificó a *S. mutans* como el principal causante de esta patología, ya que corresponde al microorganismo aislado con mayor frecuencia desde las lesiones. Este microorganismo juega un papel importante en el inicio de éstas, ya que cuenta con mecanismos que favorecen la adhesión bacteriana en sitios susceptibles (Tanzer y cols., 2001). Sin embargo, estudios posteriores muestran que existe una gran diversidad de microorganismos en lesiones de caries. Incluso, se ha demostrado que 10-20% de los sujetos con lesiones de caries no poseen niveles detectables de *S. mutans*, sino que exhiben otras especies productoras de ácidos (Aas y cols., 2008).

b) Hipótesis de la placa no específica (Theilade, 1986):

Se propone que las lesiones de caries son producidas por la actividad de una biopelícula compleja, compuesta por una gran diversidad de especies, entre ellas *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp. y *Streptococcus* del tipo no mutans, las cuales conviven con *S. mutans* durante el desarrollo de la lesión. Esta teoría descarta que *S. mutans* sea la única especie generadora de las lesiones de caries (Aas y cols., 2008; Takahashi & Nyvad, 2011).

c) Hipótesis de la placa ecológica (Marsh, 1994):

Propone que la enfermedad de caries tiene una etiología microbiana inespecífica, ya que cualquier especie acidogénica y/o acidúrica puede contribuir con el desarrollo de lesiones de caries, esto, sumado a que existe una relación directa y dinámica entre el entorno y los microorganismos, generando una composición cualitativa y cuantitativamente diferente en cada superficie del medio oral. Por lo tanto, no existe un microorganismo específico que sea responsable del desarrollo de lesiones de caries, sino más bien depende de un conjunto de factores que van afectando de manera favorable o desfavorable en el desarrollo de dicha enfermedad.

Takahashi & Nyvad (2011) complementaron esta hipótesis, proponiendo la hipótesis de la placa ecológica extendida. Los autores relatan que la biopelícula microbiana es dinámica, donde las especies de *Streptococcus* del grupo no mutans y *Actinomyces* son las responsables de mantener la estabilidad dinámica del proceso de mineralización/desmineralización de la superficie dentaria, donde la ganancia neta de mineral es mayor que la pérdida de este. Cuando la estabilidad se pierde durante un tiempo prolongado, habrá mayor crecimiento de especies de *Streptococcus* del grupo no mutans acidogénicas, lo que dará inicio al desarrollo de lesiones de caries. Si el balance de pH no es recuperado, se verán favorecidas las especies bacterianas acidúricas, tales como *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., donde en esta etapa la pérdida de mineral es más rápida por lo que se favorece la progresión de lesiones de caries.

Otros autores, mencionan que la diversidad de especies asociadas a lesiones de caries es variable, siendo mayor en lesiones de caries no cavitadas en comparación a lesiones cavitadas, donde esta diversidad disminuye considerablemente a medida que se acidifica el pH del medio (Kianoush y cols., 2014).

Diversos estudios asocian fuertemente al género *Lactobacillus* con la enfermedad de caries, demostrando una alta prevalencia de este género bacteriano en individuos con lesiones de caries, en comparación con individuos libres de éstas (Badet & Thebaud, 2008; Piwat y cols., 2010; Kianoush y cols., 2014; Caufield y cols., 2015).

1.2. *Lactobacillus* spp.

El género *Lactobacillus* pertenece a la familia *Lactobacillaceae*. Corresponden a bacilos Gram positivo, anaerobios estrictos y facultativos, no formadores de esporas, comúnmente encontrados en alimentos, agua, suelo, aguas residuales, humanos y muchos animales. *Lactobacillus* spp. producen ácido láctico como su principal producto metabólico, a partir de carbohidratos fermentables. De esta manera, generan un ambiente de pH bajo que ellos pueden tolerar, pero que es inhóspito para la mayoría de los demás microorganismos (Caufield y cols., 2015).

Las especies de *Lactobacillus* aisladas a partir del tracto gastrointestinal humano y vaginal se consideran microorganismos autóctonos, y confieren efectos beneficiosos al hospedero debido a que estimulan la inmunidad e impiden la colonización de patógenos exógenos (Saulnier y cols., 2009). Además, se han utilizado ampliamente en el ámbito industrial, ya que se consideran probióticos, siendo introducidos en productos lácteos, así como también, utilizados como tratamiento de diferentes enfermedades que afectan el tracto gastrointestinal (Ouweland y cols., 2002; Hojsak, 2019).

Por otra parte, diversos estudios muestran que tanto niños como adultos que presentan lesiones de caries tienen mayor abundancia de bacterias del género *Lactobacillus* en boca (Caufield y cols., 2015). Dentro de las especies aisladas con

frecuencia se encuentra *Lactobacillus salivarius*, la cual ha sido obtenida desde saliva y lesiones de caries (Piwat y cols., 2010; Kianoush y cols., 2014; Caufield y cols., 2015; Luzanto, 2016).

1.3. *Lactobacillus salivarius*.

Se ha estudiado *in vitro* el efecto de *L. salivarius* sobre bacterias cariogénicas como *S. mutans*, observando una disminución en el crecimiento y en la producción de glucanos insolubles por parte de este microorganismo (Higuchi y cols., 2019). También *L. salivarius* muestra un efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas y disminución de recuento bacteriano de cultivos doble especie de *S. mutans* en conjunto a *Candida albicans*, por lo que, para algunos investigadores, *L. salivarius* puede considerarse un microorganismo que podría presentar efectos anticariogénicos (Krzyściak y cols., 2017). Sin embargo, debido a su característica acidogénica y acidúrica, estaría relacionado a la progresión de lesiones de caries (Moslehi-Jenabian y cols., 2009). Además, estudios anteriormente señalados donde *L. salivarius* se ha aislado desde lesiones de caries, descartan la posibilidad de que este sea un microorganismo anticariogénico (Piwat y cols., 2010; Caufield y cols., 2015; Luzanto, 2016).

Los efectos de *L. salivarius* sobre otros microorganismos patógenos pueden ser producto de mecanismos de comunicación intercelular, los cuales inhiben o exacerbaban ciertas características tales como el crecimiento, adhesión, formación de biopelículas y expresión de genes (Wasfi y cols., 2018; Higuchi y cols., 2019). Dentro de los sistemas de comunicación, estos efectos podrían estar asociados al sistema de comunicación intercelular llamado *quorum sensing* (QS) (Wasfi y cols., 2018).

1.4. *Quorum Sensing*.

Numerosas especies bacterianas utilizan un mecanismo de comunicación intercelular conocido como *quorum sensing* (QS). Este proceso de señalización permite que las células bacterianas coordinen su expresión génica de una manera dependiente de la densidad celular (Ng & Bassler, 2009; Kareb & Aïder, 2020). Este

mecanismo está mediado por pequeñas moléculas difusibles denominadas autoinductores, que se sintetizan intracelularmente y se liberan al entorno. A medida que aumenta el número de células, también lo hace la concentración extracelular del autoinductor (Kolenbrander y cols., 2010). Una vez que se alcanza un umbral de concentración, se produce la unión del autoinductor a los receptores afines en las células bacterianas, lo que desencadena una cascada de transducción de señales que produce cambios en toda la población bacteriana. Por lo tanto, este proceso permite que las células actúen de manera cooperativa y competitiva, facilitando el comportamiento adaptativo dependiente de la densidad de la población (Galloway y cols., 2011; Kareb & Aïder, 2020).

En bacterias Gram negativo, se presenta una clase importante de autoinductores, las acil homoserina lactonas (AHL). Cada señal de AHL se une a un receptor afín, y desencadena la expresión de un conjunto de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos como la virulencia o la formación de biopelículas (Sandoz y cols., 2007; Kareb & Aïder, 2020).

En las bacterias Gram positivo, las moléculas autoinductoras suelen ser péptidos o aminoácidos pequeños modificados, denominados péptidos autoinductores (AIP), que son detectados por receptores asociados a la membrana, que finalmente activan la expresión de un conjunto específico de genes, por ejemplo, genes involucrados en la virulencia, competencia o esporulación (Romero y cols., 2011; Rémy y cols., 2018). Los AIP están codificados genéticamente y, por lo tanto, cada especie bacteriana es capaz de producir señales peptídicas con secuencias únicas (Waters & Bassler, 2005; Novick & Geisinger, 2008; Rémy y cols., 2018).

Además de estos mecanismos, otro sistema de comunicación es el sistema mediado por autoinductor-2 (AI-2). El AI-2 es un diéster de borato de furanosilo, el cual corresponde a un producto metabólico de una sintasa codificada por el gen *luxS*. Esta enzima LuxS está involucrada en la conversión de S-ribosil-homocisteína (SRH) en homocisteína y 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), que se convierte espontáneamente en AI-2 (Trappetti y cols., 2011; Guo y cols., 2014; Rémy y cols., 2018). Como muestra la figura 1, la proteína LuxS forma parte del ciclo metilo activado por lo que también está relacionada directamente con el metabolismo de

aminoácidos de las bacterias. La homocisteína que genera la enzima LuxS es la molécula intermediaria de la síntesis de metionina, precursora de S-adenosilmetionina (SAM) involucrada en la transferencia de grupos metilo. Estos grupos son fundamentales para la síntesis de proteínas, ADN, ARN, entre otras (Lebeer y cols., 2007; Wilson y cols., 2012).

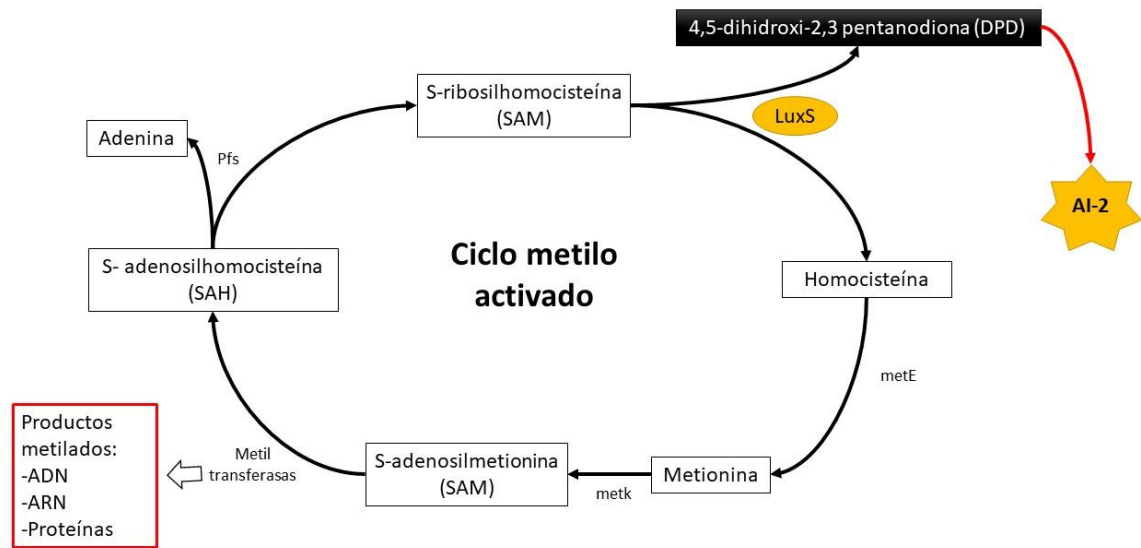


Figura 1. Representación gráfica simplificada del Ciclo Metilo Activado. La enzima LuxS forma parte del Ciclo Metilo Activado, donde uno de sus productos corresponde a DPD, el cual se convierte espontáneamente en AI-2 (Modificado de Lebeer y cols., 2007; Wilson y cols., 2012).

El Autoinductor-2 fue encontrado originalmente en la bacteria marina *Vibrio harveyi*, y ahora se sabe que es un sistema de *quorum sensing* ampliamente distribuido entre bacterias Gram positivo y Gram negativo (Kareb & Aider, 2020). Se ha descrito que este sistema participa en muchos procesos, incluida la virulencia y la formación de biopelículas (Jiang y cols., 2019). Una característica notable de este sistema es que, debido a la prevalencia de los receptores de señal AI-2 en una amplia gama de especies bacterianas, puede facilitar la comunicación intra e interespecies. Esta señalización de AI-2, entre dos especies diferentes, conduce a una interacción cooperativa o competitiva (Romero y cols., 2011; Rémy y cols., 2018).

Kolenbrander y cols. (2010), proponen que la sucesión de especies bacterianas que componen la biopelícula dental está directamente relacionada a los niveles de AI-2 presentes en la matriz extracelular, donde las bacterias comensales se mantienen y proliferan en la superficie dentaria a niveles bajos de AI-2 (concentración menor a 100 pM). Posteriormente, otros colonizadores iniciales como *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp. se unen a la biopelícula. Esta colonización y aumento de la biomasa conlleva a un aumento de los niveles de AI-2 lo que mejora la comunicación de las especies de transición como *Fusobacterium* spp. Finalmente, cuando la concentración de AI-2 alcanza niveles más altos (10.000 pM) los patógenos son favorecidos para su crecimiento y unión a las comunidades de las biopelículas en desarrollo, donde paulatinamente predominarán por sobre las bacterias comensales y las relacionadas con salud.

Dentro de las bacterias en las que se ha descrito el sistema de comunicación mediado por AI-2 se describen diversas especies que habitan en la cavidad oral, tales como *Actinomyces oris*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bifidobacterium dentium* y *L. casei* (Rickard y cols., 2006; Wright y cols., 2013; He y cols., 2015; Riquelme, 2018).

En trabajos de investigación previos a este proyecto, se describió que *Lactobacillus casei* ATCC 4646, proveniente de lesión de caries, es capaz de producir AI-2. Así mismo, se evidenció que sus niveles en cultivo aumentan en la fase de crecimiento exponencial media, para luego ir disminuyendo en la fase estacionaria. Además, se encontró un efecto positivo en la adhesión y formación de biopelículas de *L. casei* en presencia de AI-2 (Villaruel, 2017; Riquelme, 2018). Estos corresponden a los únicos estudios de *quorum sensing* mediado por AI-2 en *Lactobacillus* spp. orales.

El estudio de Moslehi-Jenabian y cols. (2009) analizó la producción de AI-2 en diferentes especies de *Lactobacillus*, entre ellas *L. salivarius* UCC118 proveniente de intestino humano. Se demostró que esta cepa de *L. salivarius* produce AI-2 alcanzando la máxima concentración en el cultivo a las 24 horas y que, además, la acidez del cultivo de este microorganismo alcanza un nivel de pH inferior a 4.

Estudios en otras especies de *Lactobacillus* no orales determinaron el rol que presenta el mecanismo de comunicación mediado por AI-2 en el crecimiento, adhesión, formación de biopelículas y resistencia al estrés ácido y alcalino, donde cada especie muestra una respuesta diferencial frente a la presencia de esta molécula autoinductora (Lebeer y cols., 2007; Yeo y cols., 2015; Liu y cols., 2018).

Dados todos estos antecedentes, en este proyecto se propone investigar la participación del sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18, lo cual no ha sido investigado. Esta bacteria ha sido aislada desde saliva de un individuo con lesiones de caries dentinarias, por lo que presentaría ciertas características propias de un microorganismo cariogénico, tales como la respuesta de tolerancia al ácido y capacidad de adherirse y de formar biopelículas, que han sido asociadas a *quorum sensing* mediado por AI-2 en otros microorganismos (Matsui & Cvitkovitch, 2010; Jia y cols., 2018; Jiang y cols., 2019). Por todo aquello, se propone que la presencia de esta molécula (AI-2) puede ser beneficiosa para la subsistencia y permanencia de esta bacteria en la biopelícula de las lesiones de caries.

2. HIPÓTESIS.

Lactobacillus salivarius SC18 posee un sistema de *quorum sensing* LuxS funcional, que a través de autoinductor-2 promueve el crecimiento, la adhesión y formación de biopelículas.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la funcionalidad del sistema de *quorum sensing* LuxS y su participación en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas en *Lactobacillus salivarius* SC18.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Analizar la presencia y funcionalidad del autoinductor-2 secretado por *Lactobacillus salivarius* SC18.
- 2.- Evaluar la participación de AI-2 en el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* SC18.
- 3.- Evaluar la participación de AI-2 en la adherencia y formación de biopelículas de *Lactobacillus salivarius* SC18.

5. METODOLOGIA.

Este estudio se encuentra adscrito al proyecto PRI-ODO 2020/002. Corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

5.1. Cultivos microbiológicos.

Lactobacillus salivarius SC18 corresponde a un aislado clínico obtenido previamente desde una muestra de saliva de un individuo que poseía lesiones de caries dentinaria, en el marco del proyecto U-INICIA Difarp 40/13, cuya identidad de especie se estableció a través de la secuenciación y análisis del gen que codifica para el 16S rRNA (Luzanto, 2016). Para su mantención, esta cepa bacteriana fue cultivada en placas con medio de cultivo selectivo para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus* llamado Mann, Rogosa Sharpe (MRS) a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 24 h, y en cultivo líquido durante 16 h.

Vibrio harveyi BB170 (*Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117™) se cultivó aeróbicamente en medio AB a 30°C (ATCC Medium: 2746 Autoinducer Bioassay (AB) Medium).

El crecimiento bacteriano en los cultivos fue monitoreado midiendo la Densidad Óptica a 600 nm (D.O. 600 nm).

5.2. Detección de AI-2 producido por *L. salivarius* SC18.

La presencia y actividad de AI-2 se detectó utilizando el sistema de bioensayo reportero *Vibrio harveyi* BB170, que produce luminiscencia en respuesta a este autoinductor. La detección se llevó a cabo utilizando el sobrenadante de cultivos de *L. salivarius* SC18. Para esto, *L. salivarius* SC18 se cultivó a 37°C en anaerobiosis en medio MRS modificado (MRSm), el cual contenía galactosa al 1% en reemplazo de glucosa (la glucosa produce un catabolito represor de la cepa reportera *V. harveyi*) (DeKeersmaecker & Vanderleyden, 2003). Se colectaron alícuotas de 2 mL de cultivo cada 1 h y se midió la D.O. a 600 nm para registrar el crecimiento. Se obtuvo el sobrenadante libre de células centrifugando el cultivo por 10 min a 8000 g, y luego fue filtrado usando filtros de membrana con tamaño de poro 0,2 µm. Por otro lado, se cultivó la cepa reportera durante 48 h a 30°C en medio AB, se lavó y

re-suspendió en medio AB fresco para obtener una D.O. a 600 nm de 0,5 final y se diluyó 1/1000. El sobrenadante previamente procesado de *L. salivarius* SC18 (centrifugado y filtrado) se mezcló con la cepa reportera en proporción 1:9, respectivamente. Se determinó la luminiscencia generada por *V. harveyi* a 30°C cada 10 min por 6 h en un lector de placas Synergy System (Biotek®). Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.) (Buck y cols., 2009). Los controles utilizados y el grupo blanco corresponden a los mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos controles y blanco utilizados en ensayo reportero de luminiscencia de la bacteria *V. harveyi* BB170.

GRUPO	RELACIÓN 1:9
Blanco	Medio MRSm + Medio AB
Control negativo	Medio MRSm + <i>V. harveyi</i> en medio AB
Control positivo	AI-2 sintetizado químicamente (5 µM) en medio MRSm + <i>V. harveyi</i> en medio AB

5.3. Análisis del efecto de AI-2 en el crecimiento de *L. salivarius* SC18.

Se realizaron curvas de crecimiento de *L. salivarius* SC18, en presencia de diferentes concentraciones de AI-2 sintetizado químicamente (0 a 100 µM) en medio de cultivo MRS a 37°C, utilizando placas de poliestireno de 96 pocillos (Orange Scientific®), midiendo la D.O. a 600 nm cada 30 minutos para registrar el crecimiento en un lector de placas Synergy System (Biotek®) programado previamente. Este ensayo se realizó en condiciones aeróbicas debido a que tanto la incubación como la lectura de las placas se hicieron en el equipo mencionado, el cual no cuenta con la posibilidad de generar un ambiente anaeróbico. Este análisis

permitió detectar si existen cambios en el crecimiento bacteriano, en presencia de AI-2. El grupo control negativo correspondió a medio de cultivo MRS.

5.4. Análisis del efecto de AI-2 en la adherencia bacteriana de *L. salivarius* SC18.

Este análisis se realizó para determinar la adhesión bacteriana durante la formación inicial de la biopelícula. Para esto, la adherencia fue analizada como describieron He y cols. (2015). Se cultivó *L. salivarius* SC18 como preinóculo durante 16 h a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se recolectó mediante centrifugación, se lavó y re-suspendió en medio MRS a una D.O. a 600 nm final de 1,0. Las células re-suspendidas fueron inoculadas al 10% en placas de poliestireno de 96 pocillos (Orange Scientific®). Previo a esto, se añadió a los pocillos 100 µL de una mezcla de proteínas salivales previamente obtenida en el laboratorio (Riquelme, 2018), y se incubó durante 1 h en agitación orbital (3D Sunflower Mini-Shaker, BIOSAN®) para formar una película salival. Posteriormente, se retiró la mezcla y se lavaron los pocillos con tampón fosfato salino una sola vez. Cada pocillo tuvo un volumen final de 100 µL en los cuales había *L. salivarius* SC18, medio MRS, y AI-2 sintetizado químicamente en diferentes concentraciones (0 a 100 µM). La incubación se realizó por 24 h, en anaerobiosis, a 37°C sin agitar. Subsecuentemente, el medio fue descartado y se lavaron los pocillos (para remover células no adheridas). Se determinó la adherencia de bacterias viables usando el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Sigma®). Se registró la D.O. a 560 nm en un equipo Synergy System (Biotek®) (He y cols., 2015).

5.5. Análisis del efecto de AI-2 en la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18.

Para analizar la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18 bajo la influencia de AI-2, estas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta.

Se cultivó *L. salivarius* SC18 como preinóculo durante 16 h a 37°C en anaerobiosis. Luego, en una placa de poliestireno de 96 pocillos se realizó la confección de la película salival adquirida tal como se describió en la sección 5.4. El cultivo de *L.*

salivarius fue centrifugado por 5 min a 5.000 g, a 21°C, se desechó el sobrenadante, y fue re-suspendido en MRS fresco a una D.O. a 600 nm de 1,0 final. Cada pocillo tenía un volumen total de 200 µL, en los cuales había *L. salivarius* SC18, medio MRS, y AI-2 sintetizado químicamente en diferentes concentraciones (0 a 100 µM). Se incubó durante 5 días a 37°C en condiciones anaerobias y sin agitar incluyendo el control negativo que correspondió a medio de cultivo MRS. Posteriormente, se procedió a teñir las biopelículas como describen Lemos y cols. (2010). Brevemente, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se lavó 3 veces con tampón fosfato salino. Se adicionó 100 µL de solución de cristal violeta 0,5% p/v incubando durante 30 minutos en agitación orbital. Se retiró cuidadosamente la solución y se hicieron lavados con 100 µL de agua destilada, hasta que el agua retirada careciera de coloración azul. Luego, a cada pocillo se adicionó 100 µL de solución de solubilización (ácido acético 33% v/v) e incubó por 5 minutos en agitación orbital. Finalmente, cuando las biopelículas se encontraban totalmente solubilizadas, se registró la D.O. a 560 nm en un equipo Synergy System (Biotek®)

5.6. Análisis estadísticos.

Todos los ensayos se realizaron en triplicados, de 3 réplicas biológicas independientes (salvo el ensayo de formación de biopelículas donde solo se pudo estudiar una réplica biológica en triplicado), y se presentan los promedios de los resultados con sus respectivas desviaciones estándar. Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y debido a que los resultados no presentaban distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa GraphPad Prism 8.2.0.

6. RESULTADOS.

6.1. Crecimiento y producción de AI-2 de *L. salivarius* SC18.

Se analizó el crecimiento de *L. salivarius* SC18 durante 22 h, observándose un crecimiento positivo, que alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 7 horas de incubación (Figura 2).

Se puede observar en la curva de crecimiento de *L. salivarius* SC18, que presenta inicialmente una fase de adaptación o de latencia, con una velocidad de crecimiento (la cual está determinada por la pendiente de la curva de cada sección) de 0,008/h (unidades de absorbancia por hora de incubación) que se prolonga hasta las 2 horas, alcanzando luego una segunda fase de crecimiento exponencial con un aumento en la velocidad de crecimiento que alcanza 0,094/h que se prolonga hasta las 7 horas de incubación. Finalmente, es posible observar la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento del cultivo disminuye considerablemente a 0,031/h.

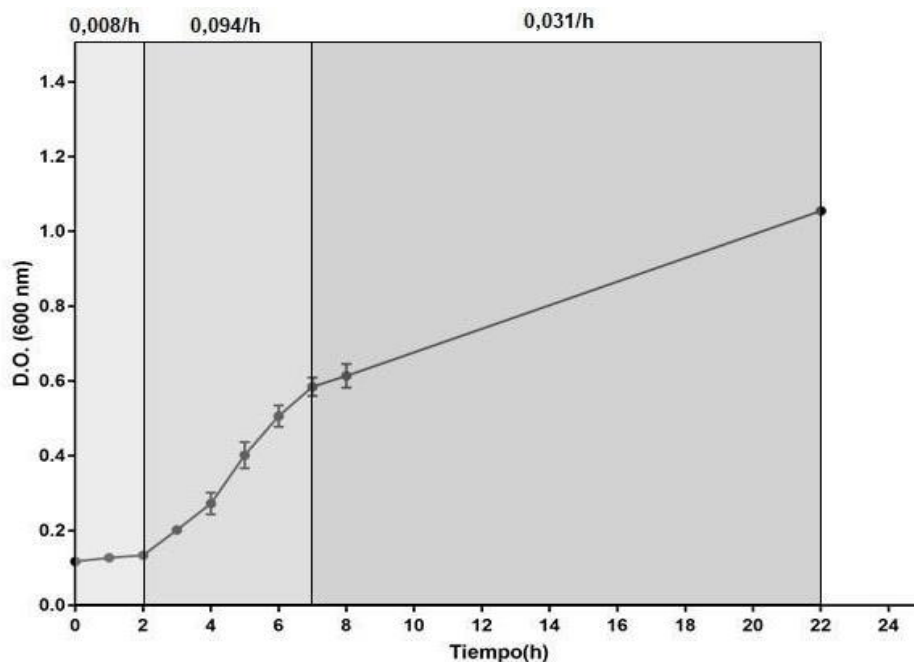


Figura 2. Curva de crecimiento de *Lactobacillus salivarius* SC18. Se muestran las velocidades de crecimiento de cada fase en el borde superior de cada sección. Cada valor corresponde al promedio de los triplicados con sus respectivas barras de error.

Con el objetivo de determinar si *L. salivarius* SC18 produce AI-2, se procedió a la detección de éste, usando la cepa reportera *V. harveyi* ATCC BAA-1117, la cual produce bioluminiscencia en presencia de AI-2. Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.), obteniendo los resultados de la Figura 3. No fue posible detectar la presencia de AI-2 en el sobrenadante de *L. salivarius* SC18, en todos los tiempos de crecimiento estudiados (Figura 3A). *V. harveyi* solo produjo luminiscencia en el grupo control positivo (Figura 3B).

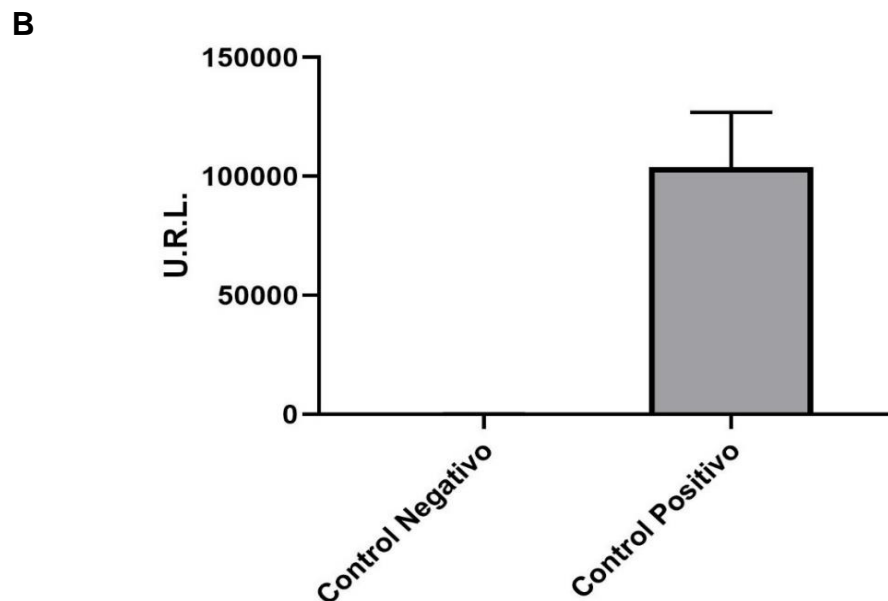
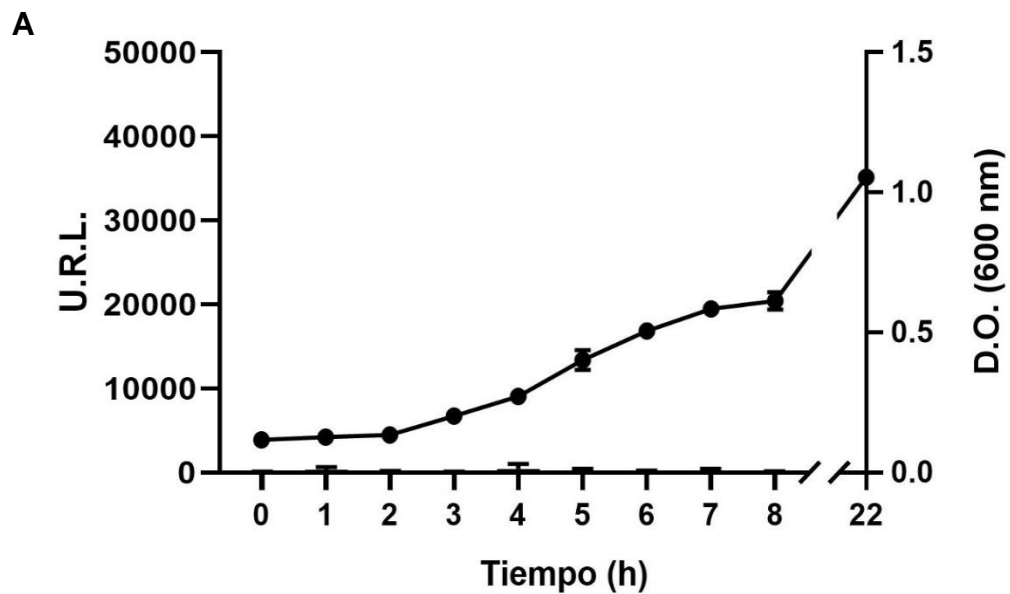


Figura 3. Análisis de producción de AI-2 por *L. salivarius* SC18. **A.** Correlación entre la producción de AI-2 (representado por barras) y el crecimiento de *L. salivarius* SC18 (representado por puntos). Tiempos de crecimiento: 0-8 y 22 h. Curva de crecimiento entre 8 y 22 h no se encuentra a escala. **B.** Controles del ensayo de luminiscencia de *V. harvey* BB170. Resultados obtenidos para los grupos control negativo y positivo. Todos los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas en triplicado.

6.2. Efecto de AI-2 en el crecimiento de *L. salivarius* SC18.

Con el fin de determinar el efecto de AI-2 sobre el crecimiento de *L. salivarius* SC18, se estudió éste en presencia y ausencia de AI-2 incorporado exógenamente, a diferentes concentraciones.

Se observó una tendencia a la disminución en el crecimiento de *L. salivarius* SC18, a medida que aumenta la concentración de AI-2 adicionado, en comparación al grupo donde no se incorporó AI-2 exógenamente (Figura 4).

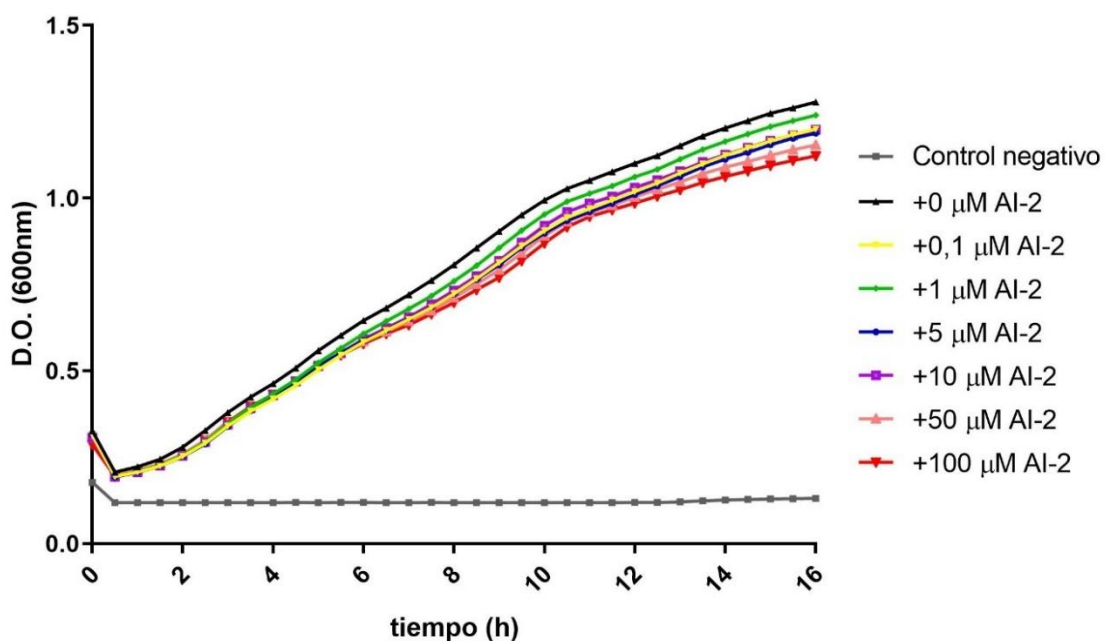


Figura 4. Efecto de AI-2 en el crecimiento de *L. salivarius* SC18. Cada curva representa el crecimiento de *L. salivarius* en presencia de diferentes concentraciones de AI-2 adicionado al medio, expresado como absorbancia a D.O. 600 nm con registro cada 30 minutos. El control negativo corresponde a medio de cultivo MRS. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado (n=9).

Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos a las 16 horas de crecimiento (Figura 5).

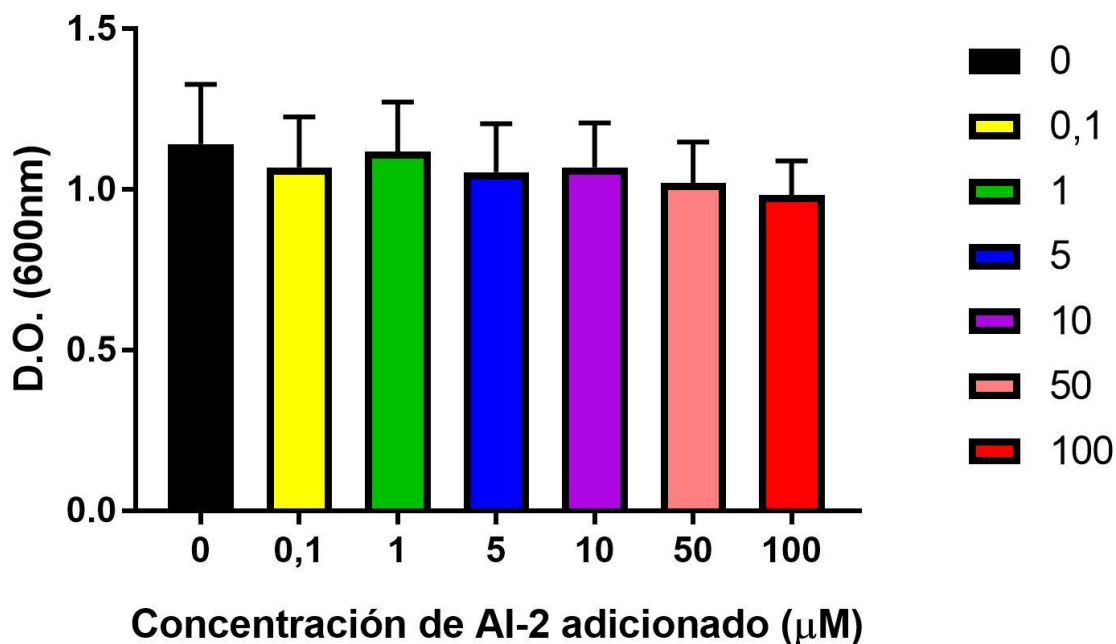


Figura 5. Efecto de AI-2 sobre el crecimiento de *L. salivarius* a las 16 horas de incubación. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,091$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado ($n=9$).

6.3. Efecto de AI-2 en la adhesión de *L. salivarius* SC18.

Para determinar el efecto de AI-2 sobre la adhesión de *L. salivarius*, se analizó ésta en presencia y ausencia de AI-2 incorporado exógenamente a diferentes concentraciones.

Luego de 24 horas de incubación se evidenció adherencia de células viables (vivas y metabólicamente activas) de *L. salivarius* a todos los pocillos de poliestireno. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adhesión con respecto a *L. salivarius* SC18 sin adición exógena de AI-2 sintetizado químicamente (Figura 6). Se observó que al adicionar AI-2, no se produjo aumento o disminución

estadísticamente significativa en la adhesión para todas las concentraciones ensayadas, en comparación al grupo control (Grupo 0).

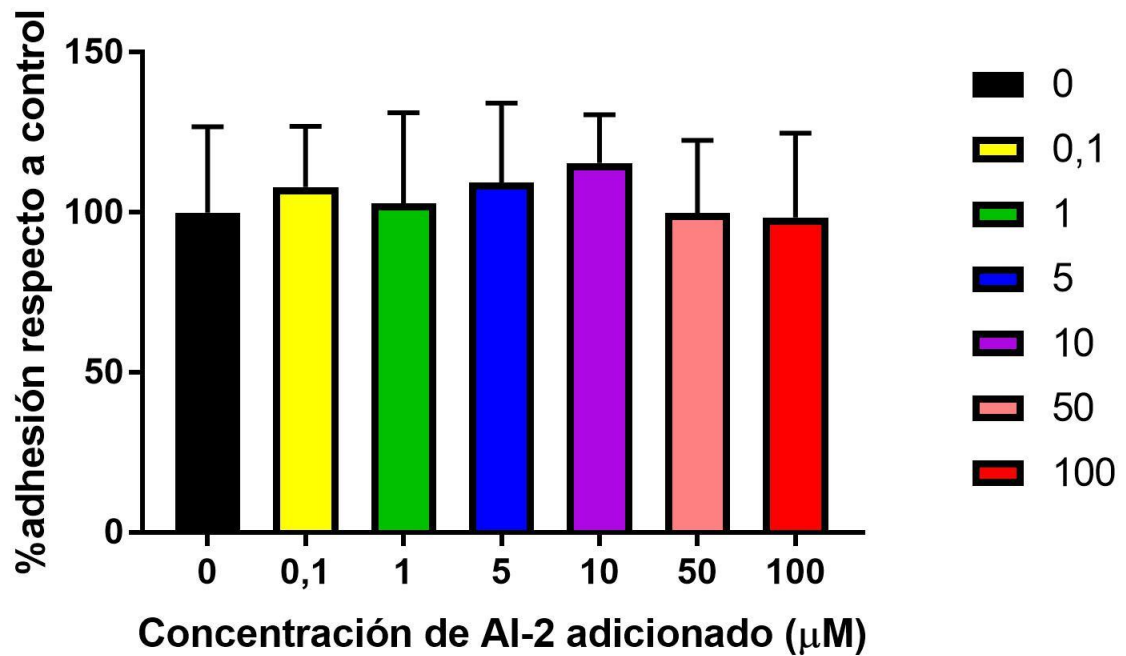


Figura 6. Efecto de AI-2 sobre la adherencia de *L. salivarius* SC18. Se expresa como porcentaje respecto a *L. salivarius* sin AI-2 adicionado exógenamente. No hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,1$ en todos los grupos). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 4 réplicas biológicas en triplicado ($n=12$).

6.4. Efecto de AI-2 sobre la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18.

Debido a la situación de contingencia nacional, sólo se pudo realizar un ensayo preliminar con una réplica en triplicado de formación de biopelículas. Este ensayo preliminar no mostró diferencias estadísticamente significativas en la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18 para todos los grupos estudiados (Figura 7).

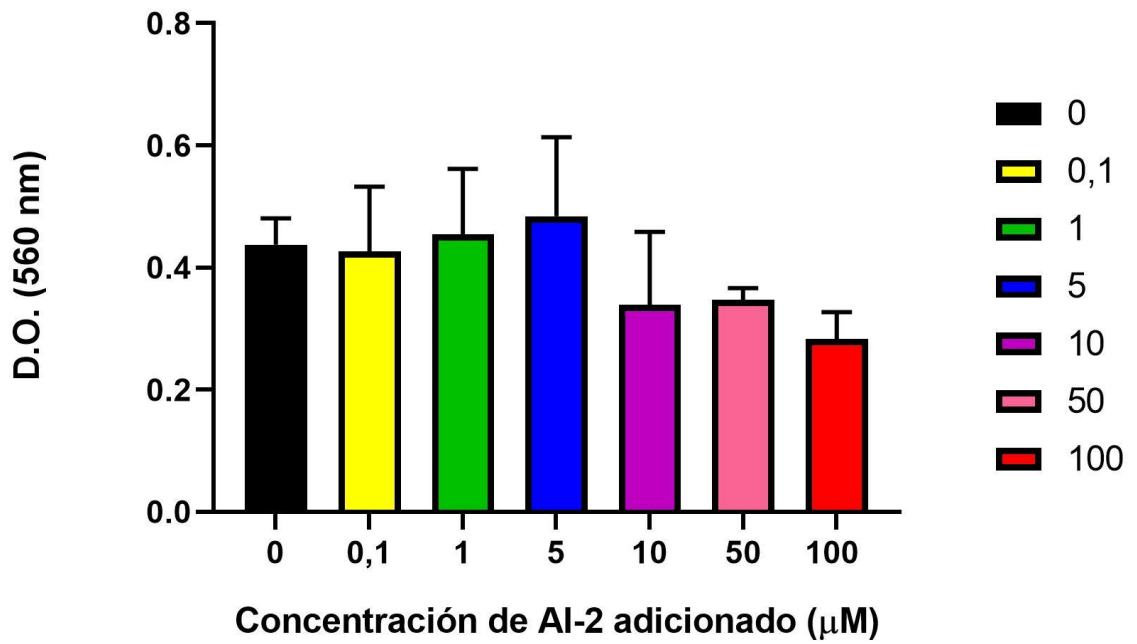


Figura 7. Efecto de AI-2 en la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18. Se utilizaron diferentes concentraciones de AI-2 adicionado. No presenta diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos ($p > 0,1$). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 1 réplica biológica en triplicado ($n=3$).

7. DISCUSIÓN.

Con los resultados obtenidos en este estudio es posible determinar que *Lactobacillus salivarius* SC18 no posee un sistema de *quorum sensing* mediado por AI-2 funcional, y esta molécula no es capaz de promover el crecimiento, la adhesión o la formación de biopelículas en este microorganismo, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.

7.1. Producción de AI-2 por *L. salivarius* SC18.

Con los datos obtenidos en el bioensayo reportero se puede determinar que la cepa *V. harveyi* BAA-1117 no produjo luminiscencia en presencia de los sobrenadantes de *L. salivarius* SC18. Existen varias hipótesis para poder explicar dichos resultados:

A. *Lactobacillus salivarius* SC18 es una bacteria que no produce AI-2. Esto ya ha sido descrito en otras especies bacterianas, como por ejemplo *Sinorhizobium meliloti* y *Riemerella anatipestifer*, que tampoco cuentan con este mecanismo (Pereira y cols., 2008; Han y cols., 2015). No obstante, se puede evidenciar que *L. salivarius* UCC118 proveniente de intestino humano si es capaz de producir AI-2 a lo largo de toda su fase de crecimiento (Moslehi-Jenabian y cols., 2009). Una conducta similar entre diferentes cepas de una misma especie fue descrita para *Lactobacillus johnsonii*, donde la cepa VPI 11088 produce AI-2 (DeKeersmaecker & Vanderleyden, 2003), en cambio la cepa NCC533 no lo hace (Moslehi-Jenabian y cols., 2009).

B. *L. salivarius* SC18 no es capaz de producir AI-2 bajo las condiciones utilizadas en este estudio. Según el estudio de Yeo y cols. (2015) la actividad de producción de AI-2 podría verse afectada y/o potenciada por diferentes factores estresores como lo son el pH del medio, la presencia de sales biliares, inanición, temperatura y presión osmótica, donde *L. rhamnosus* y *L. plantarum* (ambas de origen intestinal) muestran cambios en la producción de AI-2 en presencia de los factores mencionados.

C. La existencia de moléculas inhibidoras de *V. harveyi* como biosensor, en los sobrenadantes de cultivo de *L. salivarius* SC18. Otros autores relatan que existen diversas bacterias, entre ellas variadas especies de *Lactobacillus*, que presentan mecanismos para inhibir el funcionamiento del sistema *quorum sensing*, por ejemplo, mediante la degradación de autoinductores o la inhibición de sus receptores (Kareb & Aider, 2020).

Dadas estas hipótesis, se hace necesario estudiar la presencia y funcionalidad del gen *luxS* en *L. salivarius* SC18 para evidenciar si cuenta con este sistema de *quorum sensing* y, junto con esto, realizar nuevos ensayos en otras condiciones para comprobar definitivamente que este microorganismo no es capaz de producir AI-2.

7.2. Efecto de AI-2 sobre el crecimiento de *L. salivarius* SC18.

Como muestran las figuras 3 y 4, si bien existe una disminución en el crecimiento de *L. salivarius* para las concentraciones mayores de AI-2 utilizadas, con respecto al grupo donde no se añadió AI-2, esta no es estadísticamente significativa, por lo que esta molécula no tiene efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano de *L. salivarius* SC18. Este resultado es similar a lo descrito en el estudio de Gu y cols. (2020), donde la adición exógena de diferentes concentraciones de AI-2 no muestra efectos significativos en el crecimiento de *L. fermentum*. Así mismo, Liu y cols. (2018) analizaron el efecto de la sobreexpresión de *luxS* en el crecimiento de *Lactobacillus paraplantarum*, la cual genera un aumento de AI-2 en el medio de cultivo, no observándose efecto sobre el crecimiento bacteriano en comparación a la cepa silvestre. Opuesto a esto, un estudio donde se evaluó el efecto de la delección del gen *luxS* en el crecimiento de *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), muestra que existe una disminución en el crecimiento en medio MRS, incluso adicionando metionina, cisteína, S- adenosilmetionina (SAM) y S- adenosilhomocisteína (SAH) (moléculas involucradas en el ciclo de producción de AI-2). No obstante, se verificó que, complementando el gen en dicha cepa mutante, se corrige el defecto en el crecimiento (Lebeer y cols., 2007).

Estos estudios indicarían que un aumento en la concentración de AI-2 no tiene efecto sobre el crecimiento de las especies estudiadas. Muy por el contrario, la ausencia de AI-2, por falta del gen *luxS*, tiene un efecto supresor del crecimiento, lo que sin embargo podría deberse a un efecto negativo en el metabolismo central del microorganismo. La enzima LuxS forma parte del ciclo del metil-activado, necesario para la síntesis de metionina y homocisteína, las cuales son requeridas para la regeneración de S-adenosilmetionina (SAM), que es la molécula involucrada en la transferencia de grupos metilo, fundamentales en la síntesis de ARN, ADN y proteínas (Lebeer y cols., 2007; Wilson y cols., 2012).

7.3. Efecto de AI-2 sobre la adhesión de *L. salivarius* SC18.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la adhesión de *L. salivarius* SC18 no se ve afectada por el aumento en las concentraciones de AI-2 en el medio externo, por lo que, para esta especie, esta molécula no es potenciadora ni reductora de su capacidad de adhesión. Estos resultados difieren del trabajo realizado por Villarroel (2017), donde se muestra que la adhesión de *L. casei* ATCC 4646 se ve beneficiada por la adición de AI-2 sintetizado artificialmente. Además, se mostró que la adhesión de *L. casei* 4646 en ausencia de AI-2 adicionado exógenamente fue muy baja, lo que también contrasta con los resultados obtenidos en este estudio, donde *L. salivarius* SC18 es capaz de adherirse eficazmente sin necesidad de adición exógena de AI-2. No existen otros estudios en *Lactobacillus* spp. orales donde se analice el efecto de AI-2 sobre su capacidad de adhesión a superficies.

En un estudio realizado por Buck y cols. (2009), se evaluó la capacidad de adhesión de una mutante de *L. acidophilus* NCFM que no presentaba el gen *luxS*, por lo cual no producía AI-2. Este análisis mostró una disminución en la capacidad de adhesión, que los autores atribuyeron a la ausencia de AI-2 en el medio, indicando que esta molécula sería necesaria para este proceso. Sin embargo, estos resultados también podrían deberse a que la ausencia del gen *luxS* no solo afecta la producción de AI-2, sino que también a otras vías metabólicas que podrían estar influyendo indirectamente en la capacidad de adhesión de las células (Wilson y cols., 2012).

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

7.4. Efecto de AI-2 sobre la formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18.

Los resultados muestran que, si bien, hay una tendencia a la disminución en la formación de biopelículas a medida que aumenta la concentración de AI-2 en el medio extracelular, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio. Esto significaría que *L. salivarius* SC18 no ve afectada su capacidad de formar biopelículas en presencia de AI-2. Cabe recordar que estos resultados se obtuvieron de una réplica biológica en triplicado, por lo que corresponden a resultados preliminares. Estos resultados también han sido reportados para una cepa de *L. fermentum* de origen lácteo, que no muestra diferencias en su capacidad de formar biopelículas en presencia de 60 μ M de AI-2 sintetizado artificialmente y añadido de manera exógena al medio de cultivo (Gu y cols., 2020).

Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por Riquelme (2018) en *L. casei* 4646, donde mediante Microscopía Electrónica de Barrido fue posible observar un aumento de la formación de biopelículas a medida que aumenta la concentración de AI-2 añadido artificialmente, mientras que, en ausencia de AI-2 adicionado exógenamente, no es capaz de formar conglomerados bacterianos sobre superficies sólidas (Riquelme, 2018). De igual manera *L. paraplantarum* L-ZS9 muestra un aumento en su capacidad de formar biopelículas al sobreexpresar el gen *luxS* (Liu y cols., 2018).

Finalmente, en el estudio de Rickard y cols. (2006), *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus oralis*, que corresponden a colonizadores tempranos de la cavidad

oral, muestran un aumento en la formación de biopelículas de doble especie frente a un aumento de 0,8 nM en la concentración de AI-2 en el medio extracelular. Sin embargo, a concentraciones mayores de 8 nM su capacidad de formar biopelículas disminuye progresivamente.

Estos hallazgos han permitido establecer que la concentración de AI-2 requerida para establecer una adecuada comunicación celular dependería de cada especie bacteriana. En la cavidad oral se ha establecido que, en las primeras etapas de colonización y formación de biopelículas, donde solo habitan bacterias comensales, las concentraciones de AI-2 serían bajas. Se ha propuesto que, a medida que aumenta la densidad de la población bacteriana, y con ello, también lo hace la cantidad de AI-2 en la matriz extracelular, generando un medio óptimo para la colonización de bacterias potencialmente patógenas, que toleran y se ven beneficiadas frente a altas concentraciones de dicha molécula (Kolenbrander y cols., 2010).

Los resultados de nuestro estudio permiten señalar que la cepa de *L. salivarius* SC18 utilizada en este análisis no es capaz de producir AI-2. Así mismo, es posible inferir que esta bacteria no posee el sistema de receptores para sensar la señal inducida por esta molécula. Al contrario de lo descrito para otros microorganismos, esta cepa habría desarrollado la capacidad de adherirse y de formar biopelículas por sí sola en superficies sólidas, sin mediar una señal de AI-2, lo que podría conferirle ventajas evolutivas para la colonización de superficies de la cavidad oral. No obstante, en bacterias Gram positivo, se describe otro sistema de QS, el cual está mediado por moléculas llamadas péptidos autoinductores (AIP), que son sensadas por proteínas transmembrana específicas para cada especie. Para algunas especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. salivarius* UCC118, este sistema de comunicación es capaz de regular la virulencia, síntesis de bacteriocinas y autólisis bacteriana (Sturme y cols., 2007; Pang y cols., 2016). Esta molécula podría ser la encargada de regular los procesos de *L. salivarius* SC18, por lo que se requiere estudiar este sistema de comunicación en esta especie de *Lactobacillus*.

Analizados los resultados de este estudio y de otros realizados en otras especies de *Lactobacillus*, se puede apreciar que cada especie tiene un comportamiento

diferente frente a la presencia o ausencia de AI-2. Esto demostraría que el sistema *quorum sensing* mediado por AI-2 en *Lactobacillus* spp. tiene un comportamiento dependiente de las condiciones del medio y de la especie.

8. CONCLUSIONES.

En este trabajo se analizó la presencia y funcionalidad del sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 en *L. salivarius* SC18, el cual no había sido descrito en esta bacteria, concluyéndose que:

1.- *L. salivarius* SC18 no posee un sistema funcional de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2.

2.- El crecimiento, la capacidad de adhesión y de formación de biopelículas de *L. salivarius* SC18 son independientes de los niveles de AI-2 presentes en el medio.

Estos antecedentes permiten inferir que *L. salivarius* SC18 tiene ventajas competitivas y evolutivas que le favorecerían a la hora de colonizar sitios de la cavidad oral.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I. y cols., (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1407–1417.
- Badet, C., & Thebaud, N. B. (2008). Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. *The Open Microbiology Journal*, 2(1), 38–48.
- Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 269–279.
- Caufield, P. W., Schön, C. N., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral Lactobacilli and Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 94(9_suppl), 110S-118S.
- DeKeersmaecker, S. C. J., & Vanderleyden, J. (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology*, 149(8), 1953–1956.
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, 111(1), 28–67.
- Gu, Y., Wu, J., Tian, J., Li, L., Zhang, B. y cols., (2020). Effects of Exogenous Synthetic Autoinducer-2 on Physiological Behaviors and Proteome of Lactic Acid Bacteria. *ACS Omega*, 5(3), 1326–1335.
- Guo, L., He, X., & Shi, W. (2014). Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Frontiers in Microbiology. Frontiers Research Foundation*. Volume 5, Article 328.
- Han, X., Liu, L., Fan, G., Zhang, Y., Xu, D. y cols., (2015). *Riemerella anatipestifer*

- lacks luxS, but can uptake exogenous autoinducer-2 to regulate biofilm formation. *Research in Microbiology*, 166(6), 486–493.
- He, Z., Liang, J., Tang, Z., Ma, R., Peng, H. y cols., (2015). Role of the luxS gene in initial biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 60–68.
- Higuchi, T., Suzuki, N., Nakaya, S., Omagari, S., Yoneda, M. y cols., (2019). Effects of *Lactobacillus salivarius* WB21 combined with green tea catechins on dental caries, periodontitis, and oral malodor. *Archives of Oral Biology*, 98, 243–247.
- Hojsak, I. (2019). Probiotics in Functional Gastrointestinal Disorders. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC. (Vol. 1125, pp. 121–137).
- Jia, F. F., Zheng, H. Q., Sun, S. R., Pang, X. H., Liang, Y. y cols., (2018). Role of luxS in Stress Tolerance and Adhesion Ability in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *BioMed Research International*. vol. 2018, Article ID 4506829, 10 pages.
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., Yao, K. y cols., (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*. Hindawi Limited. Volume 2019, Article ID 2015978, 15 pages.
- Jenkinson, H. F. (2011). Beyond the oral microbiome. *Environmental Microbiology*. (Vol. 13, pp. 3077-3087)
- Kareb, O., & Aïder, M. (2020). Quorum Sensing Circuits in the Communicating Mechanisms of Bacteria and Its Implication in the Biosynthesis of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: a Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 12(1):5-17.
- Kianoush, N., Adler, C. J., Nguyen, K. A. T., Browne, G. V., Simonian, M., & Hunter, N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS ONE*, 9(3): e92940

- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*. Jul;8(7):471-80.
- Krzyściak, W., Kościelniak, D., Papież, M., Vyhouskaya, P., Zagórska-Świeży, K. y cols., (2017). Effect of a *Lactobacillus salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm. *Nutrients*, 9(11), 1242.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Fadda, A. A., Marchal, K. y cols., (2007). Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 860–871.
- Lemos, J. A., Abranches, J., Koo, H., Marquis, R. E., & Burne, R. A. (2010). Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 666, 87–102.
- Liu, L., Wu, R., Zhang, J., & Li, P. (2018). Overexpression of *luxS* promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 2628.
- Loesche. (1992). The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease - PubMed. Retrieved June 16, 2020, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1291362/>
- Luzanto, C. (2016). Resistencia a ácido e identificación de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. de la cavidad oral de niños de 7 a 11 años sin experiencia de caries versus con caries dentinarias profundas. Universidad de Chile.
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*.

- Matsui, R., & Cvitkovitch, D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd London, UK. 5(3): 403–417.
- MINSAL (2017). Plan Nacional de Salud Bucal 2018 - 2030. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- Moslehi-Jenabian, S., Gori, K., & Jespersen, L. (2009). AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 295–302.
- Ng, W.-L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 197–222.
- Novick, R. P., & Geisinger, E. (2008). Quorum Sensing in Staphylococci. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 541–564.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 279–289.
- Pang, X., Liu, C., Lyu, P., Zhang, S., Liu, L. y cols., (2016). Identification of Quorum Sensing Signal Molecule of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(49), 9421–9427.
- Pereira, C. S., McAuley, J. R., Taga, M. E., Xavier, K. B., & Miller, S. T. (2008). *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2 (AI-2) synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria. *Molecular Microbiology*, 70(5), 1223–1235.
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R. y cols., (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*. Lancet Publishing Group. 394(10194):249-260.
- Petersen, P. E. (2003). The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO

- Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31(SUPPL. 1), 3–24.
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A. y cols., (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–16.
- Piwat, S., Teanpaisan, R., Thitasomakul, S., Thearmontree, A., & Dahlén, G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Molecular Oral Microbiology*, 25(2), 157–164.
- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., y cols., (2018). Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. 2018 Mar 7; 9: 203.
- Rickard, A. H., Palmer, R. J., Blehert, D. S., Campagna, S. R., Semmelhack, M. F. y cols., (2006). Autoinducer 2: A concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular Microbiology*, 60(6), 1446–1456.
- Riquelme, N. (2018). *Efecto de Bifidobacterium dentium sobre Lactobacillus casei a través de quorum sensing, mediado por autoinductor-2*. Universidad de Chile.
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chemical Reviews*. American Chemical Society. 111(9):5492-505.
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M., & Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15876–15881.
- Saulnier, D., Kolida, S., & Gibson, G. (2009). Microbiology of the Human Intestinal Tract and Approaches for Its Dietary Modulation. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1403–1414.
- Sturme, M. H. J., Francke, C., Siezen, R. J., de Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2007). Making sense of quorum sensing in lactobacilli: A special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*. 153(Pt 12):3939-3947.

- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303.
- Tanzer, Livingston, & Thompson. (2001). The Microbiology of Primary Dental Caries in Humans - PubMed. Retrieved June 16, 2020, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11699974/>
- Theilade, E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(10), 905–911.
- Trappetti, C., Potter, A. J., Paton, A. W., Oggioni, M. R., & Paton, J. C. (2011). LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 79(11), 4550–4558.
- Villarroel, R. (2017). Participación de quorum sensing, mediante autoinductor-2, en la adhesión y desarrollo de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646. Universidad de Chile.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M., & Ashour, H. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 1972–1983.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.
- Wilson, C. M., Aggio, R. B. M., O'Toole, P. W., Villas-Boas, S., & Tannock, G. W. (2012). Transcriptional and metabolomic consequences of luxS inactivation reveal a metabolic rather than quorum-sensing role for LuxS in *Lactobacillus reuteri* 100-23. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1743–1746.
- Wright, C. J., Burns, L. H., Jack, A. A., Back, C. R., Dutton, L. C. y cols., (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology*, 28(2), 83–101.

Yeo, S., Park, H., Ji, Y., Park, S., Yang, J. y cols., (2015). Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7): fiv065.

10. ANEXOS.



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLÓGICA
UNIVERSIDAD DE CHILE



DIFO

CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 8 de diciembre de 2020
Mat.: Asigna Código DIFO: 2020/002

Dra. Claudia Lefimil V,
Investigador Responsable Propuesta PRI-ODO
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
PRESENTE

Estimada Dra. Lefimil:

Informo a usted que con fecha de Registro de Inscripción 8 de enero de 2020, el Proyecto de Investigación PRI-ODO titulado: "Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms", ha sido asignado con el siguiente Código de Inscripción en la Dirección de Investigación:

PRI-ODO 2020 CÓDIGO DIFO: 2020/002

Este Proyecto cuenta con:

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

A partir de la Fecha de Registro del Proyecto, usted debe considerar el período de duración de 1 año, por lo tanto:

Fecha de Entrega Informe Final:	8 de enero de 2021
---------------------------------	--------------------

Desearándole el mayor de los éxitos, se despide cordialmente,





PROF. DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS
DIRECTOR (S) INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

AMB:com

Correo electrónico: investigacion@odontologia.uchile.cl - Teléfono: +56 (0) 22 59743947
Facultad de Odontología de la Universidad de Chile - Casilla 8000 Independencia, Santiago