



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TERAPIAS DE REEMPLAZO PARA EL CONTROL
MICROBIOLÓGICO DE *Streptococcus mutans*

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

LARA ORTIZ LAURA AZUCENA

TUTOR: Q.F.B. FERNANDO JAVIER FRANCO MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Dios:

Por sus bendiciones, su amor, por ser el centro de mi vida, por permitirme conocerlo, por escuchar mis súplicas y por darme la maravillosa vida que tengo.

A mis padres Ma.Inés y Arturo, y a mi hermana Mary:

Por su paciencia, amor, por ayudarme a construir mi personalidad y hacerme una gran persona, los amo con todo mi corazón!!!, gracias!!!, este sueño es todo suyo, así como mis logros son siempre pensando en ustedes. Agradezco a Dios por ponerlos en mi vida.

A mis abuelitos Mamá Lupita o más bien, un ángel que siempre cuida mi vida, y mi querido Abue, a mis tías Carmen y Paty, a mi tío Bulmaro y a mis primos, en especial a Abraham:

Por darme ánimos para continuar y no desfallecer, por sus consejos, su amor, por aquella sonrisa que me brindan y que alimenta mi alma.

A mis queridos profesores:

Agradezco todas las atenciones que me brindó el tutor de este trabajo, el QFB. Fernando Javier Franco Martínez, por sus conocimientos aportados para la realización de este trabajo y en mis estudios, por su experiencia, por su paciencia y por confiar en mí como yo en Él.

Y por supuesto, a todos los profesores que me acompañaron en mi vida escolar que uno a uno fueron construyendo este gran sueño.

En especial a la Mtra. Alma Laura Baires Varguéz agradezco su apoyo incondicional en este trabajo y en toda mi carrera escolar, por mostrarme el amor a la Odontología, en especial al área Microbiológica y por convertirse en una guía en mi vida, la quiero y la admiro.

A todos mis amigos, en especial a “Los de siempre” y a mis amigos de la Clínica Aragón :

A todos ustedes, muchas gracias, saben que los llevé en el corazón y que sus sonrisas y su amistad hicieron más llevaderos mis estudios y siempre formarán parte importante de mi vida y de mi corazón. ¡Los re-quiero!

A mi querida Escuela de Pastoral, en especial al Pbro. José Manuel Zarza Medrano, a Vicky y Elsa:

Por ayudarme a crecer en mi vida espiritual, por mostrarme el amor a Dios y a la Teología, mi gran pasión, por sus consejos, oración, por sus palabras hermosas y por creer siempre en mí.

A todos los trabajadores de la Facultad de Odontología, enfermeras, intendencia, trabajadores en gral., en especial a los de la Clínica Aragón, Lulú, Oti, Paty, Amelia, Vicky, Lety, Ale, Lic.:

Por convertirse en pieza clave para la realización de mis estudios, por ser mis amigos y amigas, por su optimismo y cariño.

Y por supuesto a mi querida Facultad de Odontología y a la Universidad Nacional Autónoma de México:

Muchas gracias por permitirme ser parte de su alumnado, por sus instalaciones, por el orgullo que siento por ella, por su historia y experiencia, por ser cuna de muchas investigaciones y de grandes Cirujanos Dentistas, pero sobre todo de grandes seres humanos, comprometidos consigo mismos y con la sociedad, que con una mano en el corazón decimos al unísono: "Por mi raza hablará el espíritu".

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	6
PROPÓSITO.....	8
OBJETIVO.....	8
1. GÉNERO ESTREPTOCOCOS.....	10
1.1 Características generales.....	10
1.2 Estructura.....	11
1.3 Clasificación.....	12
1.3.1 <i>Streptococcus mutans</i>	13
1.3.1.1 Características estructurales y antigénicas de <i>Streptococcus mutans</i>	14
1.3.1.2 Factores de cariogenicidad.....	15
1.3.1.3 Cultivos.....	16
1.3.1.4 Metabolismo.....	17
2. TERAPIAS DE REEMPLAZO.....	22
2.1 Indicaciones.....	24
2.2 Requisitos que un microorganismo debe poseer para ser empleado como cepa efectora.....	24
2.3 Ventajas de las terapias de reemplazo.....	26
2.4 Desventajas de las terapias de reemplazo.....	27
2.5 Métodos de las terapias de reemplazo.....	28
2.6 Técnica de recombinación genética para crear cepas efectoras.....	29
3.SIMBIOSIS.....	33
3.1 Control microbiológico por medio de simbiosis.....	34
3.2 Investigaciones simbióticas entre <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Veillonella alcalescens</i>	36

3.3 Ventajas y desventajas de las simbiosis entre <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Veillonella alcalescens</i> encontradas en diversos estudios.....	36
4. LAS BACTERIOCINAS: PRINCIPAL FACTOR DE VIRULENCIA PARA CREAR CEPAS EFECTORAS.....	38
4.1 Clasificación de las bacteriocinas.....	39
4.3 Modo de acción.....	42
4.4 Genes de bacteriocinas.....	45
4.5 Regulación de la síntesis de bacteriocinas.....	47
4.6 Receptores blanco de las bacteriocinas.....	50
4.7 Aislamiento y purificación.....	50
5. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Streptococcus mutans</i> EMPLEADOS EN LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO	51
5.1 Virulencia.....	51
5.1.1 Adhesión.....	52
5.1.2 Deficiencia de la enzima Lactato deshidrogenasa.....	53
5.1.3 Mutacinas.....	53
6 CEPA EFECTORA BCS3-L1: EL MEJOR PROTOTIPO PARA LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO.....	57
6.1 Características de la cepa efectora BCS3-L1.....	59
6.2 Construcción de la cepa BCS3-L1.....	61
6.3 Aplicaciones de las terapias de reemplazo.....	64
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXO: GLOSARIO.....	75

INTRODUCCIÓN

Las terapias de reemplazo se han considerado como una medida alternativa ante la gran prevalencia de enfermedades infecciosas y en gran medida a al incremento de la resistencia de las bacterias ante los antibióticos. Parece a simple vista, una tecnología novedosa, pero en realidad desde hace 130 años a la fecha, se continúan haciendo estudios al respecto, con la finalidad de promover la salud integral del individuo por periodos prolongados.

Se ha conocido de manera coloquial como terapia probiótica y su mayor difusión ha sido en productos lácteos, los cuales incrementan en gran medida la microbiota intestinal.

En el caso de la caries, desde hace 30 años, se han comenzado los estudios referentes a su control a través de las terapias de reemplazo, considerándola como una enfermedad específica causada principalmente por *Streptococcus mutans*, un microorganismo que a través del metabolismo de la sacarosa, produce ácido láctico, ocasionando así la disminución del pH del ambiente y como consecuencia la desmineralización de la estructura dura del diente. Es así como el estudio minucioso de este microorganismo permite conocer su capacidad patógena y las posibles intervenciones de la ingeniería genética para reducir su virulencia. En base a esto, el descubrimiento de diferentes rasgos fenotípicos, tales como la producción de bacteriocinas, enzimas y las interacciones ecológicas, como la simbiosis, han permitido la construcción de cepas efectoras inocuas que reemplacen a la cepa cariogénica. Los primeros estudios al respecto, fueron la actividad simbiótica de *Streptococcus mutans* con *Veillonella alcalescens*, ésta última utiliza el ácido láctico para su metabolismo por lo que evita la acidificación del medio y la desmineralización de la superficie del diente. Sin embargo, las alteraciones ecológicas pueden tener consecuencias y

en este caso, *Veillonella alcalescens* produce menadiona, la cual es un nutriente de las bacterias periodontopatógenas.

Posteriormente, se utilizaron técnicas de recombinación de ADN para la creación de cepas efectoras de *S.mutans*, en su construcción, incluyó una bacteriocina de gran espectro antimicrobiano, la mutacina 1140, ésta es muy eficaz porque mata a la cepa cariogénica. En adición, se suprimió la enzima lactato deshidrogenasa pues es la responsable de catalizar la conversión de piruvato en ácido láctico, lo que podría ser letal en *S.mutans*, para evitarlo una enzima alcohol deshidrogenasa proveniente de *Zymomonas mobilis* es insertada, lo que dio origen a la cepa BCS3-L1, el mejor prototipo de cepa efectora.

Una empresa llamada ORAGENICS creada por el Dr. Jeffrey Hillman, el principal investigador de las cepas efectoras en la prevención y tratamiento de la caries, realiza productos basados en la tecnología de recombinación de ADN, por lo que se espera que puedan salir entre el año 2009 y 2010.

PROPÓSITO

El propósito de la presente investigación es dar a conocer una alternativa consistente para la prevención y control de la caries conocida como terapias de reemplazo, pues difieren de los métodos convencionales, como los selladores de fosetas y fisuras y la aplicación de fluoruro, en que su protección es a la largo plazo y en toda la cavidad oral, no solo las superficies oclusales, brinda formas más sencillas de aplicación, pues no requieren un aislamiento absoluto ni aditamentos especiales, las instrucciones al paciente son sencillas, pues puede ingerir alimentos después de su aplicación, no tiene que esperar un tiempo determinado para que la cepa comience su acción. Además no se han detectado efectos adversos y las cepas pueden ser administradas aún en casos de fluorosis, caries extensas, caries proximales, no solo en lesiones incipientes y en niños pequeños, ya que en el caso del fluoruro no se recomienda en edades tempranas pues pueden deglutirlo. Quizá sea discutible en un inicio su costo, pero existen muchos probióticos en el mercado incluidos en los productos lácteos, con costos accesibles, muy difundidos y comercializados.

OBJETIVOS

- Conocer las principales características y metabolismo de *Streptococcus mutans*, el principal microorganismo involucrado en la caries dental.
- Identificar los principios de las terapias de reemplazo, los requisitos que deben cubrir las cepas efectoras, las ventajas y desventajas, así como los diversos métodos para su aplicación.
- Estudiar la simbiosis, particularmente de *Streptococcus mutans* y *Veillonella alcalescens*, con el fin de conocer las interacciones

ecológicas que establecen estos microorganismos en diversos estudios, lo que permitirá conocer sus posibles aplicaciones.

- Determinar las características, clasificación y modo de acción de las bacteriocinas, principal rasgo fenotípico en la construcción de las cepas efectoras.
- Establecer los principales factores de virulencia de *S.mutans* como son: la colonización, adhesión, la deficiencia de la enzima Lactato deshidrogenasa y la producción de mutacinas, las cuales son consideraciones importantes para elegir el microorganismo más adecuado para reemplazar a la cepa cariogénica.
- Reconocer los estudios previos, características y construcción de BCS3-L1, la cepa considerada como el mejor prototipo de cepa efectora.
- Describir las posibles aplicaciones clínicas de las terapias de reemplazo, particularmente de la caries, así como, los productos comerciales basados en esta tecnología.

1. GÉNERO ESTREPTOCOCOS

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se presentan morfológicamente como cocos grampositivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas. Son aerobios, aunque pueden desarrollarse en condiciones anaerobias. (fig.1)

Carecen de catalasa y su tolerancia al oxígeno se debe a peroxidasas flavínicas y pseudocatalasas; sin embargo, la ausencia de ellas en algunos casos y la producción en otros de peróxido de hidrógeno suponen unas circunstancias desfavorables que *in vitro* pueden evitarse con la adición de sangre en los cultivos cuya catalasa descompondría el agua oxigenada. En cualquier caso su crecimiento al aire se ve favorecido por una atmósfera del 5-10% de CO₂.

Presentan un metabolismo fermentativo y producen esencialmente ácido láctico (homofermentativos). Su temperatura óptima de desarrollo es de 36 +/- 1 °C.

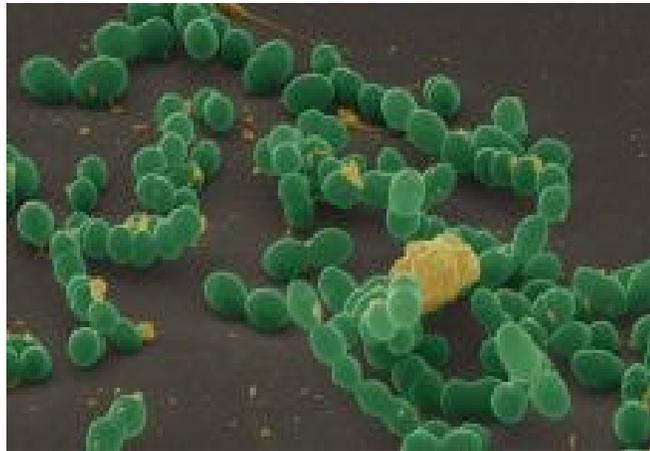


fig.1 *Streptococcus mutans*

Fuente: <http://www.popsci.com/scitech/article/2008-01/germ-could-save-your-life?>

1.2 ESTRUCTURA

- Ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Tienen un carácter antigénico e intervienen en procesos de adhesión. (fig.2)
- Carbohidratos de la pared celular. Poseen carácter antigénico e intervienen en procesos adhesivos, de agregación y coagregación bacteriana.
- Proteínas de la pared celular.
 - ❖ Poseen carácter antigénico de forma independiente o asociadas a los ácidos lipoteicoicos y fimbrias.
 - ❖ Otras muestran actividades enzimáticas como glucosil y fructosil transferasas.
 - ❖ Algunas se comportan como adhesinas fijándose a superficies blandas de forma individual.
 - ❖ Pueden actuar como elementos receptores de glucanos.
 - ❖ Importantes factores de virulencia por su acción antifagocitaria, interfieren en la activación del complemento o se comportan como superantígenos.
 - ❖ Fimbrias. Intervienen en la adhesión, agregación y coagregación bacteriana.
 - ❖ Cápsula. Están constituidas de ácido hialurónico o polisacáridos.
 - ❖ Glucocálix. Constituida por polisacáridos extracelulares de los tipos glucanos, fructanos o ambos.

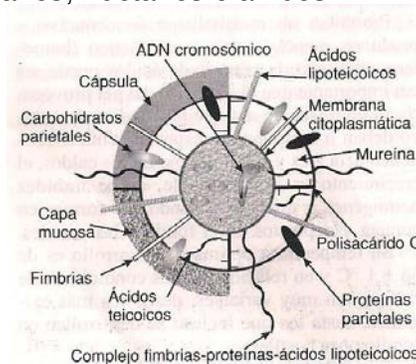


fig 2. Estructura de los estreptococos

1.3 CLASIFICACIÓN

- Hemólisis. Permite distinguir los estreptococos α , β , γ .
 - α - hemólisis: zona estrecha de hemólisis parcial y coloración verde alrededor de la colonia.
 - β - hemólisis: zona ancha, limpia y translúcida de hemólisis completa alrededor de la colonia.
 - No hemólisis (γ)

- Estructura antigénica. Este carácter permite distinguir a los serogrupos de Lancefield, denominados con letras mayúsculas, A a W, excepto I, J, LL y Ñ. Pueden diferenciarse sensibles a un disco de bacitracina con 0.04 unidades; los del grupo B hidrolizan el hipurato o producen CAMP. Los del grupo D son capaces de desarrollarse en medio con bilis.
 - Grupo A: incluye los patógenos más importantes para el ser humano como *Streptococcus pyogenes*.
 - Grupo B: contiene una especie *S. agalactiae* que habita en el aparato genital femenino y causa infección en los neonatos.
 - Grupo C: algunos causan enfermedades en animales.
 - Grupo D: incluye los enterococos y junto con los del grupo A causan enfermedades en los humanos.

- Características genéticas y químicas estructurales.

En el ámbito odontológico, partiendo de una visión práctica pueden dividirse:

- *Streptococcus viridans*. Suelen ser α - hemolíticos, con un halo verdoso alrededor de las colonias.
- Otros estreptococos.

Streptococcus viridans

- Tienen su hábitat principal en la cavidad oral; colonizan tanto superficies duras como blandas.
- Su significación patógena más importante va ligada a la formación de placas y a la producción de caries.
- Se relacionan con otros procesos patológicos como gingivitis, abscesos periapicales, pulpitis, celulitis, etc.
- Sus colonias muestran un halo verdoso, porque son β -hemolíticos. (fig.3)



fig.3 Colonia en Agar Sangre de *S. viridans*

Fuente: http://www.microbelibrary.org/asmonly/details_print.asp?id=1986

1.3.1 *Streptococcus mutans*

Es la especie más frecuente del grupo. Se aísla en el 70-90% de la población no desdentada y resistente a la caries, sobretodo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva.⁽¹⁾ Se considera el principal patógeno en la caries dental.^(2,3,4,5,6,7,8)

En 1924, Clarke aisló ciertos organismos a partir de lesiones cariosas que el denominó *Streptococcus mutans* debido a que con la coloración de Gram, ellos se observaban más de forma ovalada que redondeada, que es la forma típica de los estreptococos, por lo que él consideró que estas bacterias eran mutantes en este género.

Las células de *S. mutans* se caracterizan por ser cocos grampositivos, presentar un diámetro de 0.5 a 0.75 μ m y disponerse en forma de

cadena, característica propia de este género. En medios de cultivo conteniendo sacarosa, esta bacteria puede producir polisacáridos extracelulares, adquiriendo una apariencia opaca, rugosa, de color blanco, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo. (fig. 4)



fig.4 Streptococcus mutans produciendo un polisacárido extracelular

Fuente: <http://www.yourreturn.org/Treatments/Teeth/index.htm>

1.3.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y ANTIGÉNICAS DE *Streptococcus Mutans*

- No poseen cápsula.
- Fimbrias poco prominentes.
- Son α y γ hemolíticas, y excepcionalmente, β - hemolíticas.
- Poseen los polisacáridos parietales c, e y f.
- En su pared presentan proteínas frecuentemente antigénicas y también involucradas en diversos fenómenos: fijación de glucanos, adhesión a la película adquirida y adhesión interbacteriana por interacciones proteína-proteína o lecitina- carbohidratos que a veces se ve favorecida por la saliva gracias a la mediación conjunta de cationes y glucoproteínas salivales.

- Tienen glucosil transferasas de bajo y alto peso molecular. Estas enzimas localizadas primitivamente en la membrana citoplasmática, emergen sobrepasando la pared celular e incluso se excretan al medio favoreciendo los fenómenos de agregación por afinidad con los componentes que originan.
- Tienen proteínas conocidas como antígenos I/ II, las cuales participan en procesos adhesivos: como adhesinas interactuando con receptores de la película como glucosiltransferasas y receptoras de glucanos en fenómenos agregativos y coagregativos entre bacterias que colonizan los dientes. ⁽¹⁾

1.3.1.2 FACTORES DE CARIOGENICIDAD

Los factores de cariogenicidad son aquellos que poseen los microorganismos que participan en el proceso carioso, siendo en su mayoría determinantes de virulencia y rasgos fenotípicos.

Estos factores en el caso de *S. mutans*, son los causantes del desequilibrio de la microbiota y entre estos se encuentran: síntesis de polisacáridos intracelulares, síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles, fructanos (posee GTF-I, GTF-S y FTF)^(1,2,8,9) y movilización de polisacáridos intracelulares por glucógeno fosforilasa, así como, extracelulares solubles por dextranasas y fructanasas. Además posee un poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, lo que hace que se incremente su potencial patógeno y su colonización en la microbiota oral. Por otra parte, presenta una importante capacidad adhesiva debido a las proteínas parietales, las cuales posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos.

Un factor de cariogenicidad que le permite una actividad antagonista sobre otras bacterias grampositivas es la producción de bacteriocinas, las cuales tienen una significación ecológica.

1.3.1.3 CULTIVOS

SÓLIDOS

- No selectivos, como agar sangre en el que las colonias aparecen como α o γ - hemolíticas con la excepción de algunas cepas de *S. mutans* que son β - hemolíticas.
- MSA (mitis-salivarius- agar) que contiene un 5% de sacarosa y otras sustancias inhibidoras de otras bacterias como telurito potásico, azul tripan y cristal violeta.
- Selectivos para los estreptococos del grupo mutans, como MSB (mitis- salivarius-bacitracina), con un 0.2 U/ml de bacitracina y sacarosa al 20%.

Tanto en MSA como en MSB, las colonias aparecen con una morfología variable, aunque con frecuencia poseen márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas y a veces rodeadas de una zona como gota de agua, hecho debido a la producción *in vitro*, que no siempre acontece de polisacáridos extracelulares.

LÍQUIDOS

Pueden utilizarse distintos caldos siempre y cuando ofrezcan suficiente nutriente para su desarrollo. El crecimiento es de tipo granular y con algunos gránulos en las paredes de los tubos. Su temperatura óptima es de 36 +/- 1 °C.

Las condiciones de cultivo son:

Se realiza una primera incubación durante 24 horas de anaerobiosis para favorecer su desarrollo y después otras 24 horas en anaerobiosis para estimular la formación de polisacáridos extracelulares y, en su caso, la de peróxido de hidrógeno.

1.3.1.4 METABOLISMO

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS

Las bacterias acidógenas son aquellas que producen ácidos, en el caso de los microorganismos cariogénicos, la producción de ácido láctico es fundamental para su virulencia ocasionando así la desmineralización del diente, lo cual se lleva a cabo por medio de la vía Embden – Meyerhof, que sintetiza ácidos a partir de la sacarosa.(fig.5) Por otra parte, las bacterias acidúricas son aquellas que toleran y sobreviven en ambientes con pH bajo e incluso lo siguen disminuyendo, lo cual en el caso de *S.mutans*, le permite estabilizarse en el medio y persistir bajo condiciones ambientales desfavorables. También existen bacterias con poder acidófilo, lo cual les permite desarrollarse en condiciones de acidez y es así, como se favorece su colonización.

Sólo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos extracelulares e intracelulares; la mayor parte se utiliza como fuente energética para el desarrollo bacteriano.

Estas bacterias son acidógenas, acidófilas y acidúricas, poseen un corto efecto post-pH y su tolerancia a los ácidos se debe: a una buena actividad ATPasa en sentido de expulsar protones, a la eliminación del azúcar

asesino mediante la puerta del lactato y síntesis de proteínas de estrés.^(1,10)

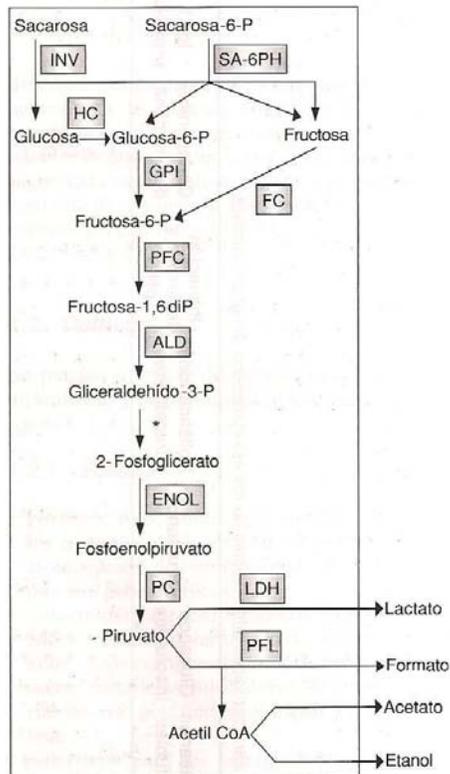


fig. 5 Producción de ácidos por *S. mutans* a través de la vía Embden - Meyerhof
Fuente: Liébana J. Microbiología oral. 2ª. ed. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2002. Pp 332.

TRANSPORTE Y ENTRADA EN LA CÉLULA BACTERIANA

Sigue el sistema de la fosfoenolpiruvato- fosfotransferasa debido a que:

- Regula los niveles de la sacarosa intracelular o sus metabolitos intermedios mediante la piruvatocinasa.
- El azúcar entra fosforilado como reserva energética.

Otro sistema utilizado por estas bacterias es el gradiente de protones y el soporte de sodio.

SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES

S.mutans, ante un exceso de sacarosa disponible sintetiza polisacáridos de reserva con la finalidad de utilizarlos para obtener energía, éstos pueden ser extracelulares e intracelulares.

Es así como forma dos tipos de polisacáridos extracelulares provenientes de la sacarosa, los cuales son glucanos y fructanos. Estos polisacáridos producen enzimas que son levanos y dextranos, con la sacarosa como sustrato, son inicialmente referidos como dextrano sacarosa y levano sacarosa. Cuando este sistema de enzimas extracelulares opera para transferir sus grupos glucosil o fructosil son llamadas glucosiltransferasas y fructosiltransferasas por lo que se abrevian GTF-S, GTF-I y FTF, las cuales pueden dar origen a glucanos hidrosolubles (dextranos), glucanos hidroinsolubles (mutanos) y fructanos, respectivamente. (fig.6)

La importancia de estos compuestos en la cavidad oral radica en:

- a) Los glucanos insolubles forman una parte importante de la matriz acelular de la biopelícula y, además son fundamentales en los fenómenos de adhesión a tejidos del hospedador, a compuestos biocompatibles y entre bacterias. ^(1,8)
- b) Los glucanos solubles y los fructanos son elementos de reserva nutricional, ya que algunas enzimas, de las propias bacterias que las producen o de otras próximas, como las glucanasas y fructanasas, rompen los enlaces α (1,6), β (1,2) y β (2,6), lo que les permite, ante la falta de nutrientes, obtener compuestos simples metabolizables. ⁽¹¹⁾

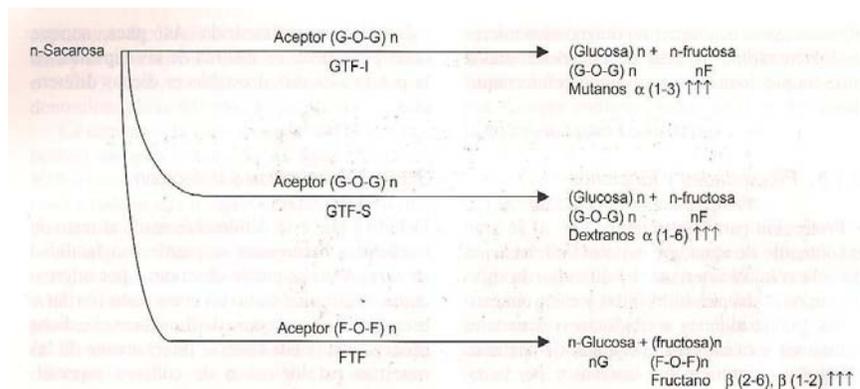


fig. 6 Polisacáridos extracelulares

Fuente: Liébana J. Microbiología oral. 2ª. ed. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2002. Pp 36

SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS INTRACELULARES

Los polisacáridos intracelulares son elementos muy importantes de reserva nutricional, ya que pueden ser movilizados ante la falta externa de nutrientes.

El proceso se inicia a partir de la glucosa 6-P en el curso de la glucólisis y la ADP- glucopirofosforilasa es el elemento básico en la síntesis.

IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE LOS AZÚCARES

Cuando existe una gran disponibilidad de azúcares varias reacciones se desencadenan con la finalidad de tener importantes reservas energéticas para lo cual, se sintetizan polisacáridos extracelulares e intracelulares. El ingreso de metabolitos es a través de la difusión simple, la difusión facilitada, gradiente de protones y simporte de sodio. Además se activa la piruvatocinasa y la lactato deshidrogenada, lo que incrementa la producción de ácido láctico y el descenso del pH. (fig.7)

En contraste, ante una escasa disponibilidad de azúcares, se movilizan los polisacáridos extracelulares e intracelulares. Además se inhibe la piruvatocinasa, se cierra la puerta del lactato, lo que disminuye la producción de ácido láctico, y el fosfoenolpiruvato se utiliza para el sistema de la fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa, es decir, el ingreso es a través de la translocación de grupos.

La formación de metabolitos intermedios formados en exceso en la glucólisis se evitará a través de la síntesis de polisacáridos extracelulares e intracelulares, la activación de la piruvato cinasa y la apertura de la puerta del lactato.

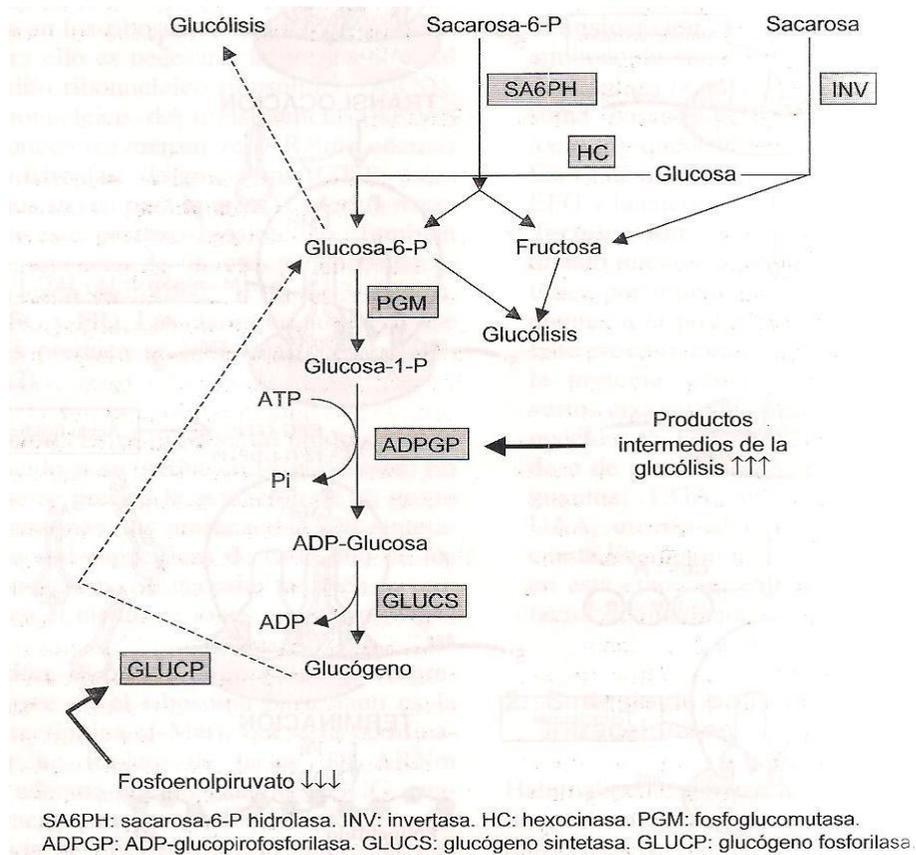


fig. 7 Síntesis de polisacáridos intracelulares

2. TERAPIA DE REEMPLAZO

La terapia de reemplazo se conoce como bacterioterapia, bacterioprofilaxis o terapia probiótica y se utiliza para prevenir una infección a través de una cepa efectora modificada natural o genéticamente, la cual se usa para colonizar intencionalmente los sitios en tejidos susceptibles del hospedero, los que son normalmente colonizados por un patógeno. Por lo tanto, si la cepa efectora se adapta mejor que la patógena, se disminuirá la colonización o el crecimiento de ésta por medio del bloqueo de los sitios de ataque, por la competición de nutrientes esenciales o por medio de otros mecanismos. Mientras la cepa efectora persiste como un residente de la microbiota residente, el hospedero es protegido potencialmente por un ilimitado periodo de tiempo. Esta terapia se basa en autores como Kenneth Anusavice, John Ruby, Morris Goldner, Paul Eglund, Robert Palmer, Yung Hua Li, Jaime Foster, Jeffrey Hillman y otros más, que describieron en algunos reportes las interacciones bacterianas positivas y negativas en el cual un microorganismo indígena específico, promueve o bloquea la presencia de un patógeno.^(2,4,12,13,14,15,16,17)

En el campo de la Odontología, la terapia de reemplazo tiene de 25 a 30 años de estudio y la Universidad de Florida posee la licencia, siendo el Dr. Jeffrey Hillman el pionero en este revolucionario método.^(7,12,18) A este respecto Kennet Anusavice afirma que en los próximos años un enfoque alternativo para la prevención de la caries, como las terapias de reemplazo y la vacuna para la caries, serán disponibles como métodos más consistentes para el control de esta enfermedad.⁽²⁾ (fig.8)

Entre los microorganismos orales indígenas hay bacterias que tienen un alto potencial patógeno para el hospedero y su resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos ha incrementado, por lo cual se han realizado investigaciones con cepas efectoras específicas, capaces de competir

contra ciertas bacterias patógenas. ^(2,3,6,12,16) Es por esto, que una de las opciones de la terapia de reemplazo, para la prevención y control de la caries dental, supone la aplicación de la ingeniería genética, en la que “cepas efectoras” (inofensivas o inocuas) de *S. mutans* podrían reemplazar a la cariogénica o “cepa silvestre” o también conocida como “cepa indígena”, para prevenir o detener el proceso carioso y para promover la óptima remineralización de la superficie del diente que puede estar desmineralizada pero que no se convierte en cavitación. ^(2,6,7,12,16,19) (fig. 9)

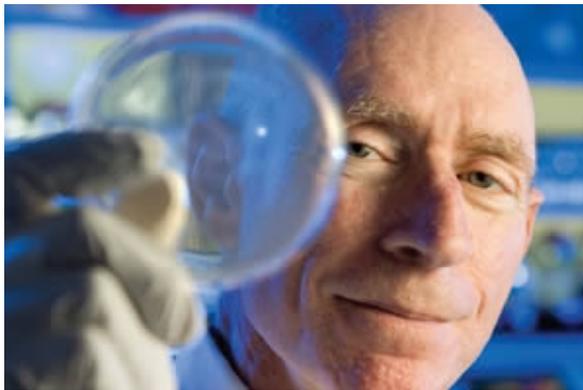


fig. 8 Dr. Jeffrey Hillman

Fuente: [http:// www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman](http://www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman)

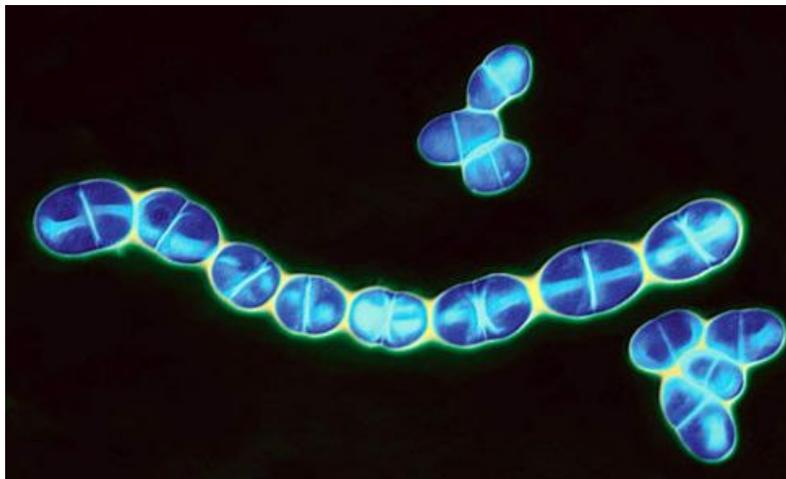


fig.9 *Streptococcus mutans*

Fuente: [http:// www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman](http://www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman)

2.1 INDICACIONES

La mayoría de los estudios sustentan la idea de que *S. mutans* es usualmente transmitido de la madre al niño (ventana de infectividad), dentro de varios periodos de tiempo a la erupción de los dientes, por lo que se indica aplicar esta terapia en niños y en sus mamás para prevenir el contagio. ^(2,8,12,19)

Por otra parte, otros estudios demostraron la dificultad para mantener las cepas efectoras de *S. mutans* en la boca de los seres humanos, especialmente cuando ellos ya tienen una cepa indígena en su organismo. ^(2,3) Desde este punto de vista en la terapia de reemplazo para prevenir la caries, la implantación de una cepa efectora podría mejorar en los niños si se inocula inmediatamente después de la erupción de los dientes y antes de la adquisición de cepas inductoras de caries. ⁽⁷⁾

Los sujetos que comienzan a tener contacto con cepas cariogénicas o que ya presentan caries, pueden ser tratados con terapias de reemplazo, debido a que las cepas efectoras poseen ventajas selectivas y significativas para colonizar lo que va a prevenir la colonización excesiva de la población residente. ^(2,3,7,20)

2.2 REQUISITOS QUE UN MICROORGANISMO DEBE POSEER PARA SER EMPLEADO COMO CEPA EFECTORA

- 1.- Debe tener un reducido potencial patógeno para promover la caries. ^(2,3,12,20,21)
- 2.- Debe persistentemente colonizar los sitios de *S. mutans*, de ese modo debe prevenir la colonización por cepas causales de enfermedad, cada vez que el hospedero entra en contacto con él. ^(2,3,6,20,21)
- 3.- Deben reemplazar a las cepas indígenas de *S. mutans*. ^(2,3,20,21)

4.- Debe ser seguro y no hacer que el hospedero sea susceptible a otras enfermedades. ^(2,6,12)

5.- No debe romper las relaciones ecológicas o causar desequilibrio. ^(3,12)

6.- Mantener una gran estabilidad genética durante mucho tiempo, con el fin de no verse afectado por los continuos cambios que sufre el medio ambiente que lo rodea. Esta propiedad garantizará en el futuro que este mismo microorganismo no sea la fuente de algún tipo de daño al huésped o pierda su efecto protector. ^(3,6,7,20,21)

7.- Poseer alguna o algunas características fenotípicas que le permitan actuar sobre el crecimiento de la cepa productora de enfermedad (en caso de reemplazo de una bacteria del mismo género y especie), desplazar la cepa nativa de su nicho ecológico, posteriormente colonizar y permanecer en este sitio definitivamente. ^(3,12)

Las características fenotípicas más comunes que ayudan en la colonización a la bacteria que realizará el reemplazo, son la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento de la cepa nativa: enzimas como la lactato deshidrogenasa, ácidos como el ácido láctico y bacteriocinas como las mutacinas. ^(22,23,24,25)

8.- Debe poseer un mayor potencial de colonización con relación a la cepa reemplazada, con el fin de desplazar a la cepa patógena y hacer muy poco probable su reaparición. ^(2,20)

9.- Por seguridad, se debe controlar la diseminación de una cepa efectora dentro de una población. ⁽²⁾

10.- No debe causar toxicidad sistémica o inmunológica. ⁽¹²⁾

11.- Debe ser de propagación fácil y preparación rápida en una forma estable para su distribución comercial. ⁽¹²⁾

La cepa microbiana que cumpla con estas características, ya sea generada en forma espontánea (natural) o por manipulación genética, se denomina cepa efectora. La forma espontánea o natural, se refiere a la transferencia de información genética, ya sea por conjugación, a través del pili sexual; transducción, por medio de un fago; y transformación en la

que la lisis de una bacteria deja libres fragmentos de ADN que son incorporados por otras bacterias. (fig.11) La siguiente investigación se basa en la manipulación genética como una medida eficaz para transferir el ADN y rasgos fenotípicos que de forma natural no es posible.

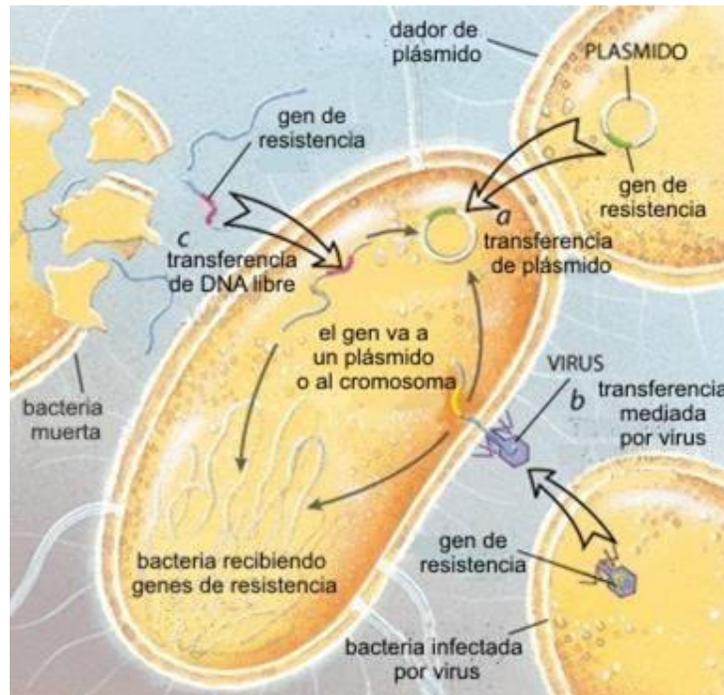


fig.11 Forma espontánea o natural para la transferencia de ADN

Fuente: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>

2.3 VENTAJAS DE LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

La principal ventaja de las terapias de reemplazo incluye una protección de larga vida, proporcionada por una rápida y sencilla aplicación, el insignificante riesgo para resultados adversos, no requiere de una amplia educación al paciente, pues las cepas efectoras actúan por sí mismas, un mínimo costo y se utilizan regímenes de higiene oral convencionales.^(2,3,18,19,20)

La terapia de reemplazo también podría conferir protección a muchas otras personas por medio de la transmisión natural que sufra la cepa

efectora dentro de la población. De esta manera la inoculación de la cepa en una generación podría en consecuencia conferir a la siguiente generación la cepa y por consiguiente la resistencia a la caries dental.⁽³⁾

Existen diferentes cepas efectoras provenientes de bacterias orales para uso en control microbiológico en la prevención, no sólo de la caries dental sino además de la enfermedad periodontal, tales como, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus rattus*, las cuales son bacterias presentes en la placa dentobacteriana y actúan balanceando las cantidades de la microbiota residente con las bacterias causantes de enfermedad, esto da como resultado una mejoría en la salud de la encía y disminución de la caries dental porque producen bajas cantidades de ácido láctico^(3,7,12,18)

2.4 DESVENTAJAS DE LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

Es importante considerar que a pesar de que la terapia de reemplazo ha sido muy atractiva durante muchos años para uso en la prevención de la caries dental, ésta no ha sido aplicada comercialmente; fundamentalmente debido a que las cepas efectoras hasta ahora investigadas, no han cumplido con todos los requisitos necesarios para ser implantadas de forma segura en la cavidad oral humana.⁽³⁾

El mayor inconveniente que se presenta para el control microbiológico en cavidad oral, específicamente en la prevención de la caries dental, se debe a que *S.mutans* además de ser habitante normal de la cavidad oral humana, es patógeno en la misma. Es por esto, que los estudios en humanos requieren el hallazgo de una cepa efectora que pueda colonizar bien y además desplazar a las cepas de *S.mutans* naturalmente residentes en la cavidad oral, manteniendo el equilibrio en el ecosistema.^(3,12)

Otro hecho importante es que no se puede predecir con claridad las implicaciones ecológicas locales que pueda tener la ausencia de la cepa nativa de *S.mutans* en la cavidad oral y la presencia de otra (s) en la misma; tampoco se conocen cuáles son las especies más hábiles para reemplazarlo en su nicho ecológico. Sin embargo, las nuevas investigaciones apuntan a cepas del mismo género y especie, las cuales tienen mejores resultados en la estabilidad del nicho. ⁽³⁾

2.5 MÉTODOS DE LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

La habilidad de la cepa efectora para colonizar persistentemente y preventivamente la cavidad oral humana, fue considerado en un inicio un fenómeno complejo dependiente de un largo número de propiedades fenotípicas.⁽²⁰⁾ Esta dificultad fue superada por el descubrimiento de una sencilla propiedad fenotípica que puede proporcionar una adecuada ventaja selectiva: las bacteriocinas.^(22,23,24,25,26,27)

Las terapias de reemplazo pueden intervenir en diferentes momentos del proceso carioso:^(2,3)

1. Adhesión inicial de los microorganismos cariogénicos a la película adquirida.
2. Coagregación de los microorganismos para iniciar la producción de ácidos, que lleva a la desmineralización del diente.
3. Progreso de la lesión cariosa.

Esto se puede realizar a través de:

- Cepas efectoras del mismo género y especie o de diferente.
- Restricciones enzimáticas como la enzima lactato deshidrogenasa.

- Asociaciones biológicas, particularmente la simbiosis, como la que se establece entre *Veillonella alcalescens* y *Streptococcus mutans*.
- Competencia de sustratos, como en el caso de la sacarosa.

2.6 TÉCNICA DE RECOMBINACIÓN GENÉTICA PARA CREAR CEPAS EFECTORAS ^(2,4,10,16,18,26,20,21,23)

La clonación de genes es la incorporación artificial de uno o más genes dentro del genoma de una nueva célula hospedera por varias técnicas de recombinación genética. Pueden usarse varios métodos para generar fragmentos de ADN genómico, incluyendo sonicación, tratamiento DNasa y restricción con enzimas de digestión. ^(10,26)

El ADN candidato es primero extraído de la fuente, purificado y cortado en fragmentos pequeños por enzimas de restricción dejando extremos cohesivos. (fig.12) Éste es después insertado dentro de un vector de ADN, el cual es previamente cortado con la misma enzima para producir extremos cohesivos complementarios. Los extremos cohesivos del vector y el candidato de ADN son ligados usando enzimas llamadas “ADN ligasas” para producir una molécula de ADN recombinante. Este proceso puede también ser usado para clonar ARN, cuando copias complementarias de ADN son producidas por transcripción reversa (usando enzimas transcriptasas reversas). El vector usado para transferir genes es usualmente un plásmido o un fago y éste con el ADN integrado tiene que ser insertado dentro de la célula con el fin a obtener múltiples copias del organismo que expresen el gen seleccionado. (fig. 13,14 y15)

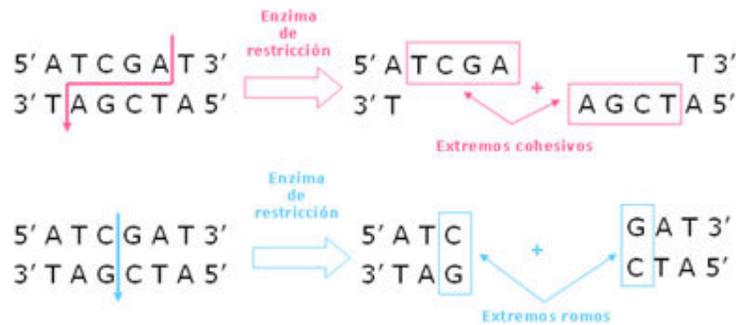


fig. 12 Corte con enzimas de restricción

Fuente: <http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adn-recombinante/como-cortar-y-pegar-el-adn-tij.php>

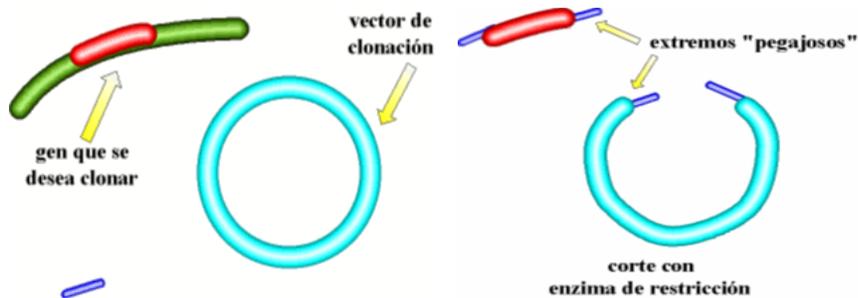


fig.13 Selección del gen y del vector

fig 14. Corte con enzimas de restricción

unión con ADN-ligasa

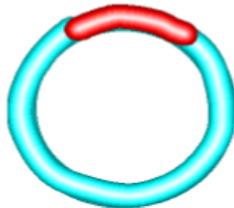


fig 15. Unión con ADN ligasa

Fuente de las fig 13, 14 y 15: <http://www.juntadeandalucia.es/.../viginsercion.html>

Esto podría ser hecho por:

- **TRANSFORMACIÓN** –Es el fenómeno de transferencia genética en virtud del cual una bacteria es capaz , sin ningún intermediario, de incorporar un ADN exógeno desnudo, cromosómico o plasmídico del medio, e incorporarlo a su ADN cromosómico por

medio de recombinación homóloga, es muy popular debido a su simplicidad, pero debe encontrarse la cepa capaz de hacerlo.

- ELECTROPORACIÓN- Aquí una corriente eléctrica produce poros en la membrana celular para que entre el vector. (fig.16)



fig. 16 Electroporador

Fuente: <http://www.unileon.es/index.php?elementoID=1615>

- GEN BOMBA - Partículas de tungsteno u oro son cubiertos con el vector e impulsados dentro de la célula por un estallido de helio.
- MICROINYECCIÓN - Inyección directa del vector dentro de la célula con una micropipeta. (fig.17 y fig.18)

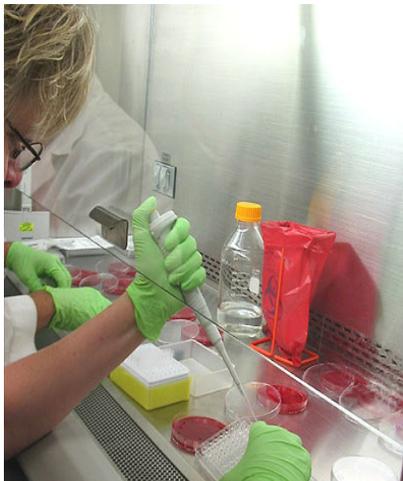


fig. 17 Micropipeta

Fuente: <http://www.oragenics.com>



fig. 18 Microinyección

Fuente: <http://www.terapiagenica.es/wordpress/wp-content/uploads/2008/02/microinyeccion.jpg>

La inserción del vector conteniendo el ADN recombinante, no necesariamente significa que toda la progenie de la bacteria contenga el elemento insertado, porque el proceso de integración del vector es al azar. Con el fin de seleccionar el clon de la bacteria que exprese el gen recombinante, otras maniobras tienen que ser adoptadas. Por ejemplo, se puede elegir un plásmido vector que transporte resistencia para antibióticos A y B. Si el ADN extraño es insertado en el medio del gen A, el cual confiere resistencia al antibiótico A, como consecuencia el gen debería ser inactivado. De esta manera, la bacteria con el ADN clonado extranjero debe ser seleccionado y llamado "biblioteca genética".

3. SIMBIOSIS

La simbiosis se consideró una herramienta muy útil para el control microbiológico de la caries dental y fue uno de los primeros intentos utilizados en las terapias de reemplazo. Su finalidad es emplear microorganismos de la microbiota residente y evitar así desequilibrios ecológicos importantes que expongan al hospedero a condiciones favorables de enfermedad. Sin embargo, la cavidad oral es habitada por una microbiota residente o nativa, que se compone de más de 500 especies, lo que dificulta encontrar la cepa adecuada que pueda reemplazar a *S.mutans*.

Etimológicamente la palabra simbiosis significa “vivir juntos”. Anton de Bary la define como “viviendo juntos con organismos de distinto nombre”. De este modo, el libro “Dorland’s Illustrated Medical Dictionary” en su 30th edición, define la simbiosis como: “viviendo juntos o en un asociación cercana de dos organismos distintos, cada uno de estos organismos son conocidos como simbiote. La asociación puede ser benéfica para ambos (mutualismo), benéfico para uno sin efecto en el otro (comensalismo), benéfico para uno y perjudicial para el otro (parasitismo)”.⁽¹⁷⁾

Roger Stainer sugirió que la naturaleza de la simbiosis será sujeta a cambios y a adaptación, dependiendo de las condiciones del medio ambiente, así como explica la conducta de estos organismos en su ambiente natural. (fig 19)

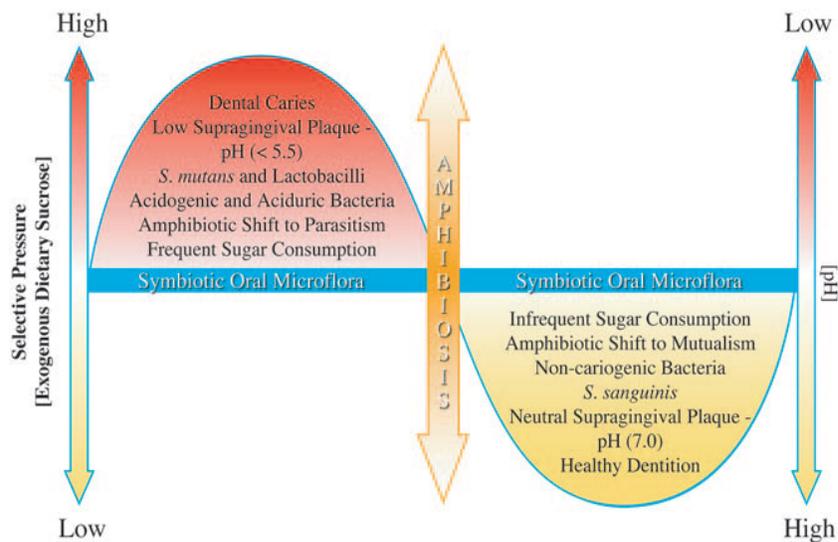


fig. 19 Simbiosis de la microbiota oral

Fuente: Ruby J, Morris G. Nature of Symbiosis in Oral Disease. J Dent Res 2005; 86 (1):8-11.

3.1 CONTROL MICROBIOLÓGICO POR MEDIO DE SIMBIOSIS

En ecología microbiana oral, el ejemplo clásico de este tipo de control es el de *Veillonella* spp, que por ser un microorganismo no fermentador de azúcares, basa todo su metabolismo en compuestos como el ácido láctico, el piruvato, el maleato, el fumarato y el oxalacetato. ^(3,10,28)

Es bien sabido, el papel que juega el ácido láctico, producto final del metabolismo de microorganismos como *S.mutans* y especies de *Lactobacillus*, en la disminución del pH y desmineralización del diente. De esta manera *Veillonella* spp al utilizar el ácido disponible en determinado microambiente oral, puede evitar que el medio se acidifique y se lleve a cabo todo el proceso de desmineralización de las superficies dentales. Es así, como estudios epidemiológicos indican que la presencia de altas concentraciones de *Veillonella* spp puede estar relacionado con índices bajos de caries. ^(3,28,29) Este efecto protector ha sido observado en ratas infectadas simultáneamente con *S. mutans*, *S. sanguis* y *Veillonella* spp,

que presentaron índices más bajos de caries, en comparación con ratas monoinfectadas con algunas de estas bacterias. ⁽³⁾

Sin embargo, es necesario tener cuidado con la posibilidad del uso de *Veillonella* spp, ya que la menadiona, uno de los productos de su metabolismo, puede ser utilizada como nutriente por microorganismos considerados como periodontopatógenos, por ejemplo, especies de *Porphyromonas* y *Prevotella*. Además *Veillonella* spp transforma el ácido láctico en acetato, que a su vez es llevado por otras bacterias del ambiente oral a caproato. El caproato es una sustancia que no solo sirve como fuente de energía a otras bacterias sino que además tiene la capacidad de disminuir el pH del ambiente que lo rodea, y en consecuencia favorece el crecimiento de otros microorganismos que requieren un medio ácido para vivir. ^(1, 29) (fig.20)

SIMBIOSIS ENTRE *Veillonella* Y *Streptococcus mutans*

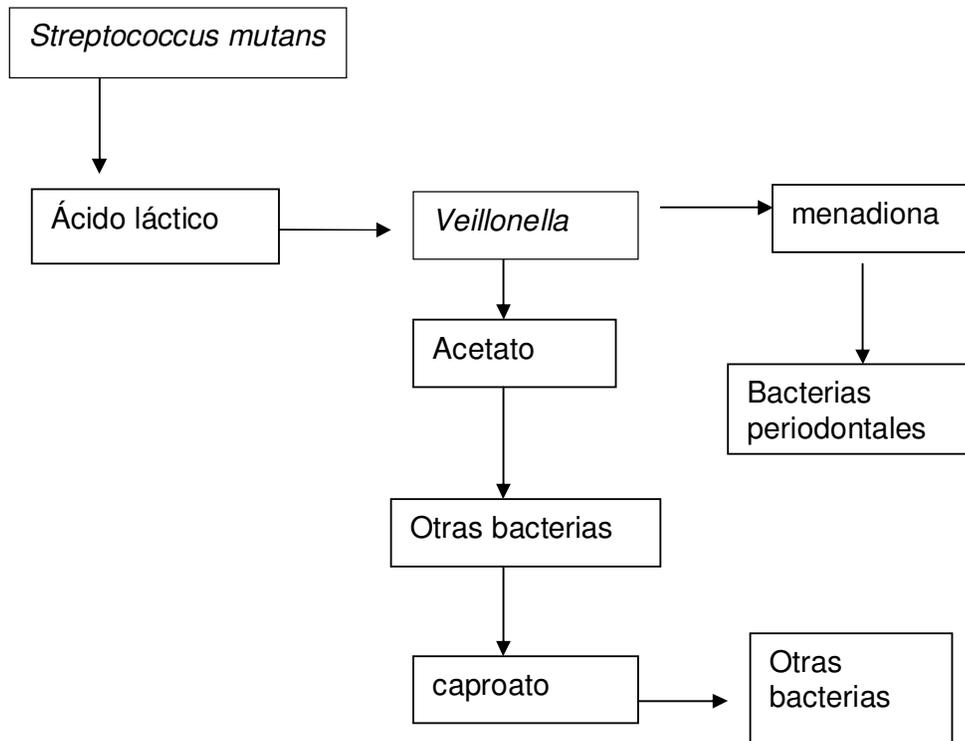


Fig. 20 Simbiosis entre *Veillonella* y *Streptococcus mutans*

3.2 INVESTIGACIONES SIMBIÓTICAS ENTRE *Streptococcus mutans* Y *Veillonella alcalescens*

Los estudios en control microbiológico empezaron en 1972 con la relación de simbiosis establecida entre *S.mutans* y *Veillonella alcalescens*. En esta investigación se demostró que el crecimiento de *Veillonella alcalescens* en la placa dental estuvo influenciado por el medio ambiente anaeróbico y por la cantidad de ácido láctico. Además, cuando *V.alcalescens* fue combinada con *S.mutans* en ratas gnotobióticas, el porcentaje de caries se redujo significativamente. ⁽³⁾

Posteriormente, siguiendo con esta idea, se investigó el crecimiento de *Veillonella alcalescens* OMZ 193 y *S.mutans* C67-1, en forma individual y en combinación con las dos. En cultivo mixto con *S.mutans*, *V.alcalescens* degradó todo el ácido láctico producido y sobrevivió en el medio con glucosa a todas las tasas de crecimiento evaluadas. Ambas especies establecieron simbiosis, en donde el ácido láctico producto metabólico de desecho del *S.mutans* fue un sustrato para *V.alcalescens*.⁽³⁾

3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA SIMBIOSIS ENTRE *Streptococcus mutans* Y *Veillonella alcalescens* ENCONTRADAS EN DIVERSOS ESTUDIOS

Veillonella spp utiliza el ácido láctico, lo cual puede mejorar el proceso carioso, pero datos provenientes de estudios en ratas, han sido ambiguos, ya que en uno de ellos se encontró menos caries cuando las ratas son co-infectadas con *Streptococcus mutans* y *Veillonella alcalescens* que cuando ellos fueron infectados solo con *S.mutans*, pero en otro estudio no se tuvo la misma evidencia. ⁽²⁸⁾

Estudios en cultivo también sugirieron un alto nivel de correlación entre el número de *Veillonella* y el número de *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans* y *Actinomyces* spp; organismos que fermentan los carbohidratos para producir ácido láctico. ⁽²⁸⁾

El análisis de otros datos sustentan la hipótesis de que *Veillonella* podría utilizar el ácido láctico producido por *Streptococcus. mutans* cuando son co- cultivados, resultando producciones altas de ambos organismos y baja concentración de ácido láctico, sin embargo, otros han encontrado altas concentraciones de ácido láctico en cultivos mixtos de *Veillonella alcalescens* y *Streptococcus mutans*. El resultado de estos datos sugiere que una cepa con propiedades específicas puede ser importante, así como el estado de enfermedad de un sitio del cual el organismo es aislado y esto puede influenciar su fisiología.⁽²⁸⁾ Además, una supervivencia ecológica en el laboratorio muestra que las cepas de *Veillonella* existen en partes específicas de la boca que son ambientes para la coagregación con *Streptococcus mutans*. ⁽¹⁴⁾ (fig. 21)

La heterogenicidad entre los miembros de un mismo género *Veillonella* spp, también supone una base para la interacción con anticuerpos policlonales y las habilidades de coagregación, ⁽²⁸⁾ lo cual es otra aplicación muy útil en el campo médico.

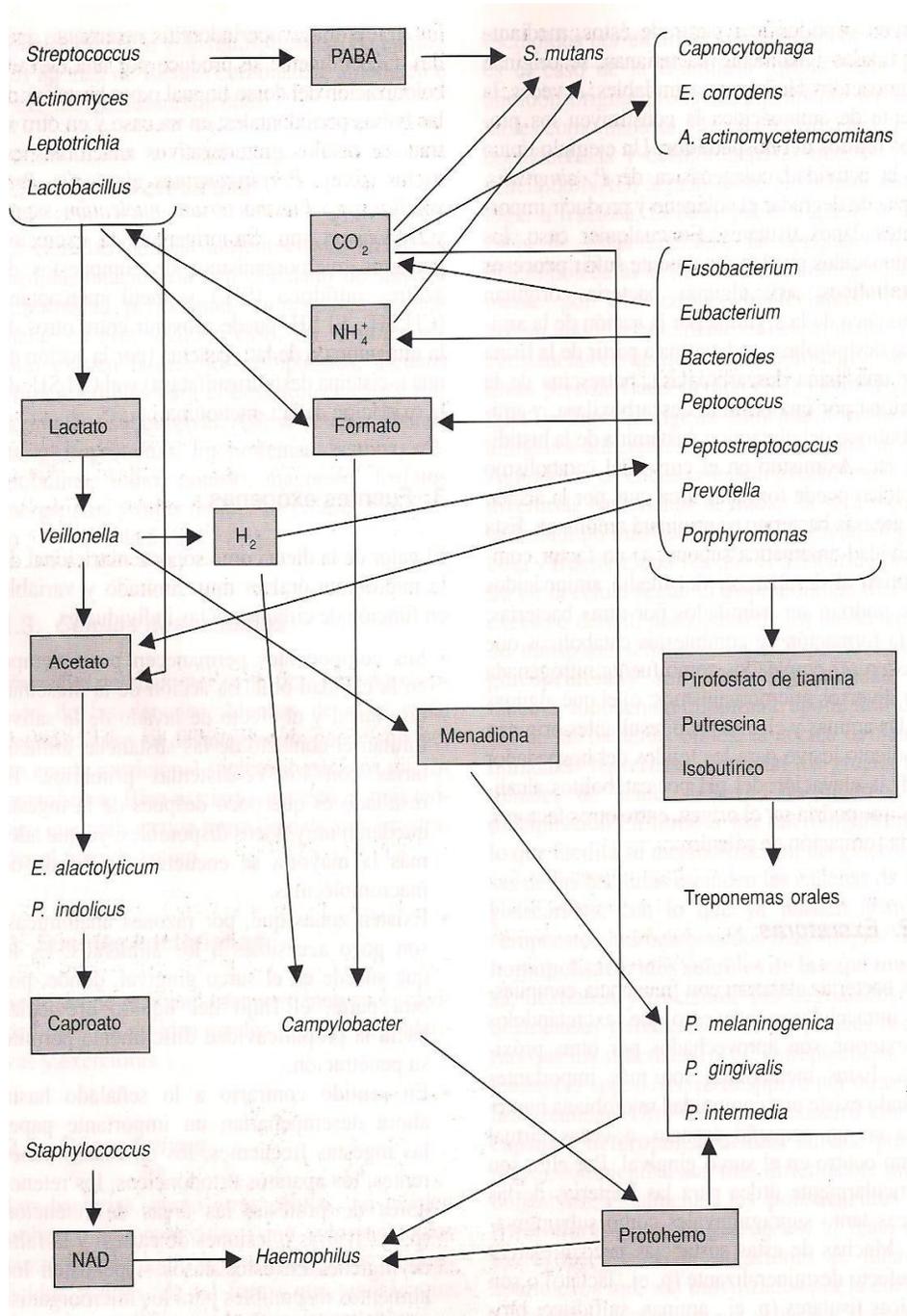


fig. 21 Interacciones ecológicas bacterianas

Fuente: Liébana J. Microbiología oral. 2ª. ed. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2002. Pp 534

4. LAS BACTERIOCINAS: PRINCIPAL FACTOR DE VIRULENCIA PARA CREAR CEPAS EFECTORAS

Las bacteriocinas son sustancias que algunas bacterias producen debido a la presencia de plásmidos o transposones, las cuales son empleadas como antibióticos, es decir, matan a otras bacterias, pero no les hacen daño a sí mismas porque tienen proteínas en la membrana citoplásmica que impiden un autoataque. Es así como las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. Las células susceptibles a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas son conocidas como células blanco o células diana.

4.1 CLASIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de producir distintos tipos de bacteriocinas. Klaenhammer propuso tres clases de ellas: ^(22,23,24,25,27)

CLASE I

La clase I son los lantibióticos, llamados así porque poseen lantionina. Son pequeños (< 5 kDa), son termoestables y actúan en la membrana. Contienen aminoácidos como lantionina y B-metillantionina.

Con base a las características estructurales y su modo de acción, los lantibióticos han sido subdivididos en dos subgrupos: A y B.

- Los lantibióticos tipo A inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática, éstos son más grandes que los lantibióticos tipo B y su tamaño varía entre 21 y 38 aminoácidos. Son moléculas alargadas con una estructura flexible en solución, actúan formando poros en la membrana y tienen carga positiva.

La nisina es un antibiótico de tipo A y es la bacteriocina mejor estudiada de bacterias grampositivas. (fig.22)

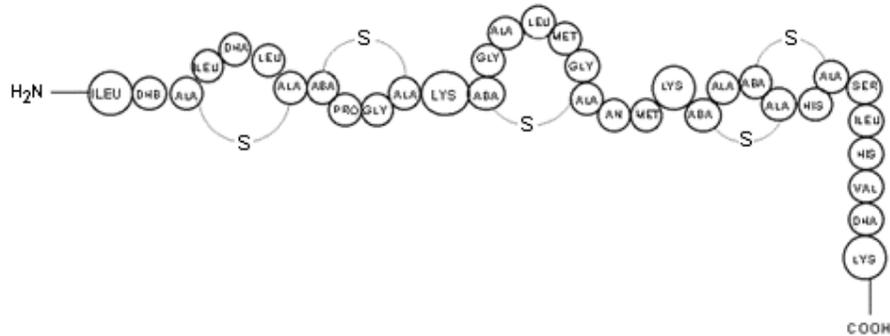


fig.22 Estructura de la nisina

ABA= ácido amino butírico ,DHA= deidroalanina ,Ala-S-Ala= lantionina ,DHB= deidroabutarina ,Aba-S-Ala= B metilantionina.

Fuente: <http://www.gigicabrini.it/farmacia/prodotti/nisina.html>

- Los antibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más globular y rígida, además no exceden los 19 aminoácidos de longitud. Son cargados negativamente o no tienen carga.

Los antibióticos de tipo B funcionan a través de inhibición enzimática. Un ejemplo es la mersacidina, la cual interfiere con la biosíntesis de pared celular.

CLASE II

Las bacteriocinas de las LAB de clase II son también pequeñas (<10 kDa), de peso molecular variable, con un tamaño de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en los péptidos.

Estas se subclasifican en 3 grupos:

- a) La clase IIa es el grupo más grande y sus miembros se distinguen por tener una secuencia amino terminal conservada (YGNGVXaaC) y una actividad compartida contra *Listeria*.

Semejante a los antibióticos de tipo A, las bacteriocinas de clase II actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática.

Algunos ejemplos incluyen la pediocina AcH , la sakacina A y la leucocina A.

- b) Las bacteriocinas de clase IIb así como la lactacina F, la lactococcina G y la lactococcina M, forman poros en las membranas de sus células blanco y están compuestas por dos proteínas que funcionan complementariamente.

- c) Un tercer subgrupo (IIc), se trata de péptidos pequeños, estables al calor, los cuales son transportados por cadenas de péptidos. Como las bacteriocinas divergicin A y acidocin B.

CLASE III

La clase III de bacteriocinas son proteínas grandes, su peso molecular es por arriba de los 30 kDa, son sensibles al calor y su modo de acción consiste en ser enzimas degradadoras de la pared celular. Entre ellas destacan las helveticinas J y V y la lactocina B.

CLASE IV

Una clase adicional de bacteriocinas ha sido propuesta (IV), esta clase se caracteriza por incorporar grupos como carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad.

BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias grampositivas son pequeñas y estables al calor (bacteriocinas péptidas) y sus actividades antimicrobianas son dirigidas a un amplio espectro de bacterias. ⁽²⁷⁾

Difieren de las bacteriocinas gramnegativas en dos aspectos fundamentales. Primero, la producción de bacteriocinas no es necesariamente el evento letal como ocurre en bacterias gramnegativas. Esta diferencia crítica se debe a que las bacterias grampositivas poseen

mecanismos de transporte para la liberación de la bacteriocina y algunas poseen un sistema de transporte específico. En segundo término, las bacterias grampositivas han desarrollado una forma de regulación más compleja que el de las bacterias gramnegativas, ya que el quórum sensing es un proceso más amplio. Además las bacteriocinas de bacterias grampositivas son en su mayoría péptidos.

4.3 MODO DE ACCIÓN

El modo de acción de las bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana celular hasta la actividad de nucleasa contra blancos de ADN, ARN, y ARNt. Además es conocido que el rango de acción inhibitoria de las bacteriocinas grampositivas se restringe a bacterias grampositivas.

Se piensa que las bacteriocinas podrían servir como antagonistas que impiden o limiten la invasión de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida, ya que cuando las fuentes de nutrientes son limitadas, las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Una función adicional ha sido recientemente propuesta para bacteriocinas de grampositivas, en la que ellas median señales de quórum sensing. ^(8,11,23,26,30,31)

Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP

y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A producida por *Lactococcus lactis subsp cremoris* se requiere de la unión a receptores membranales. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK, producidas por *Lactobacillus plantarum*, dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana. En la clase III, que son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción se desconoce y deberá ser más estudiado.

En general, es probable que las estructuras secundarias de los péptidos activos tengan un papel importante en la actividad biológica ya que las α -hélices y láminas β -plegadas son anfifílicas, lo que sugiere una oligomerización de los monómeros en las membranas de acuerdo al mecanismo de formación de poros, con los lados hidrofóbicos hacia parte lipídica de la membrana y los hidrofílicos formando el poro del canal. (fig.23 y fig.24)

En un medio ambiente no estructurado, es decir, aquél en donde no existe un equilibrio ecológico, una pequeña población de células productoras de bacteriocinas no podrá invadir una población establecida de células sensibles, pues éstas las superan en número. Esto ocurre porque las

productoras pagan un precio por la elaboración de la bacteriocina (los costos energéticos de acarrear un plásmido y producción de letalidad) pero no todas tienen la capacidad de matar células blancas. La cepa productora derrota a la cepa sensible, debido al efecto de la bacteriocina sobre la última. Sin embargo, la cepa resistente, es aquella sobre la que la bacteriocina no tiene acción, por lo tanto, gana contra la cepa productora porque la última enfrenta los altos costos de producción y liberación de toxina mientras la otra paga solamente los costos de resistencia. En contraste, en un medio ambiente estructurado, este juego permite un equilibrio global casi estable, en el cual las tres cepas pueden persistir constantemente. (27)

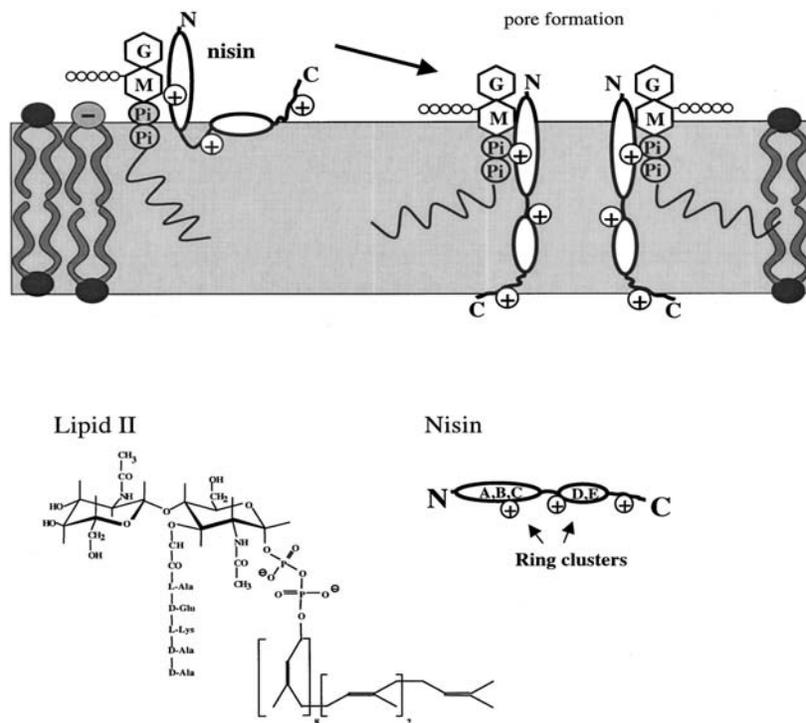


Fig. 23 Formación de poros de la nisin

Fuente: Widemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers O, Bierbaum G, Kruijff B, Sahl H. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Molecular Microbiology* 2006; 61 (2): 285-296

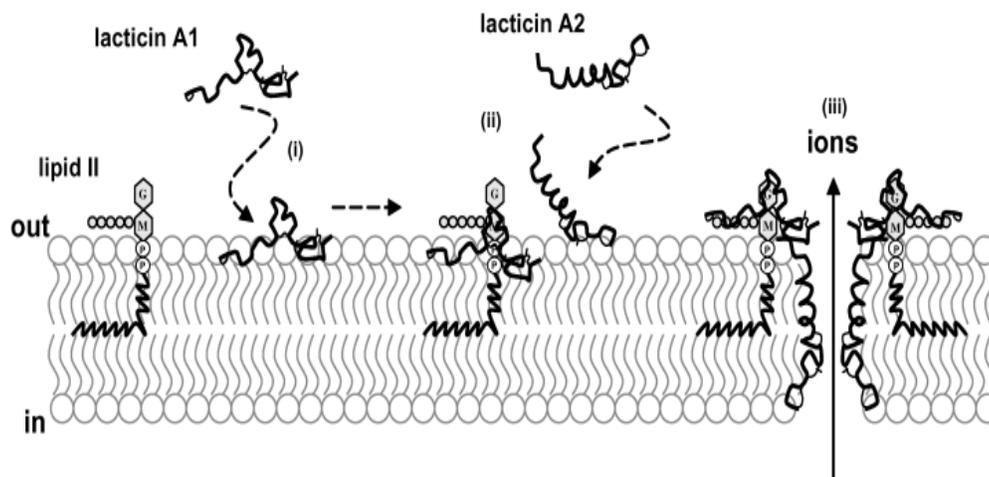


fig.24 Formación de poros de otras bacteriocinas Lactacin A1 Y Lactacin A2

Fuente: Widemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers O, Bierbaum G, Kruijff B, Sahl H. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Molecular Microbiology* 2006; 61 (2): 285-296.

4.4 GENES DE BACTERIOCINAS

Los genes son clasificados de acuerdo a su tipo de función, según lo descrito por el Laboratorio Nacional Los Álamos con respecto a la secuencia de base de datos de los patógenos orales: ⁽²⁶⁾

1. Sistema de transducción de señales
2. Respuesta a la tensión
3. Metabolismo energético
4. Procesos celulares centrales
5. Genes con función desconocida

Las bacteriocinas son moléculas pequeñas que son codificadas consecuentemente por genes pequeños ⁽²⁵⁾ y éstos son los responsables de su producción, además se asocian con la movilidad de elementos, con el cromosoma, con transposones o con plásmidos. ^(22,23,24)

Las bacteriocinas de bajo peso molecular de bacterias grampositivas generalmente, aparecen como prepéptidos que son subsecuentemente modificados para formar moléculas biológicamente activas y maduras (bacteriocinas).

En la mayoría de los operones de las bacteriocinas, los determinantes genéticos son asociados para la producción de bacteriocinas activas , estos incluyen: ⁽²²⁾

1. El gen estructural codificando la pre- pro- bacteriocina
2. El gen que codifica la proteína de la inmunidad
3. Los genes responsables para el procesamiento y transporte de las bacteriocinas.
4. y, en algunos casos, los genes que codifican las enzimas involucradas en modificaciones post- trasccripcionales.

Las bacteriocinas de bacterias grampositivas y en particular los lantibióticos requieren mucho más genes para su producción de lo que requieren las bacterias gramnegativas. Por ejemplo, la agrupación de genes necesarios para la síntesis de nisina incluyen un gen para el prepéptido (*nisA*), genes para enzimas que modifican aminoácidos (*nisB*, *nisC*), un gen para el rompimiento del péptido líder (*nisP*), un gen para la secreción (*nisT*), genes para la inmunidad (*nisI*, *nisFEG*) y genes para la regulación de expresión (*nisR*, *nisK*). ^(22,27) Muchas bacteriocinas de bacterias grampositivas, incluyendo la nisina, están localizadas en transposones, es por eso que se debe enfatizar que la identificación de genes que codifican bacteriocinas, no necesariamente significa que se relacione con los procesos de actividad antimicrobiana, y la escasez para detectar la actividad antimicrobiana no necesariamente significa que los genes involucrados en la producción de bacteriocina sean deficientes.

4.5 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE BACTERIOCINAS

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen. La placa dentobacteriana es considerada una biopelícula, la cual es regulada por un sistema de transducción de señales llamada el quórum sensing.

El quórum sensing es uno de los mecanismos primarios por el cual la bacteria percibe y responde a los estímulos externos. Varios procesos celulares son regulados por este sistema de transducción de señales, incluyendo la formación de la biopelícula, producción de bacteriocinas, quimiotaxis, el desarrollo de la competencia, esporulación, reacciones ante situaciones de tensión, expresión de la virulencia, bioluminiscencia. En las bacterias patógenas, el sistema de transducción de señales regula la expresión de genes que son necesarios para la patogénesis.
(6,8,11,23,26,30)

Durante el quórum sensing, la bacteria produce y detecta pequeñas moléculas difusoras de señales, llamadas autoinductores, producidas a niveles basales, para percibir la densidad de la población y regular la expresión del gen para optimizar su fisiología.^(6,30,31)

Cuando la densidad de la población aumenta, la concentración de las moléculas autoinductoras también incrementa y alcanzan un umbral que activa una vía de transducción de señales, derivando la cascada de expresión del gen. Esto capacita a las células para cambiar su conducta y funcionar como un grupo, es decir, como un organismo multicelular.⁽³⁰⁾ La

habilidad de la bacteria para usar los mecanismos del quórum sensing, para comunicarse con otra y funcionar como un grupo brinda un beneficio significativo para la colonización de la bacteria en el hospedero, la defensa contra competidores antagonistas y la adaptación al medio ambiente.

El sistema de transducción de señales está compuesto de una proteína histidina quinasa que sirve para percibir la presencia de un péptido fuera de la célula y transmitir la señal sobre la membrana para regular la respuesta que activa la transcripción de los genes blanco. ^(11,23,30,31) (fig. 25, fig. 26 y fig.27)

La regulación de expresión no es dependiente del ciclo celular, sino de la densidad del cultivo. Ha sido demostrado que la nisina A actúa como una feromona proteica en la regulación de su propia expresión, lo cual es controlado por un sistema típico de transducción de señales de dos componentes y de muchos sistemas que censan el quórum sensing. Los genes involucrados son *nisR* (el regulador de respuesta) y *nisK* (la kinasa sensora).⁽³¹⁾

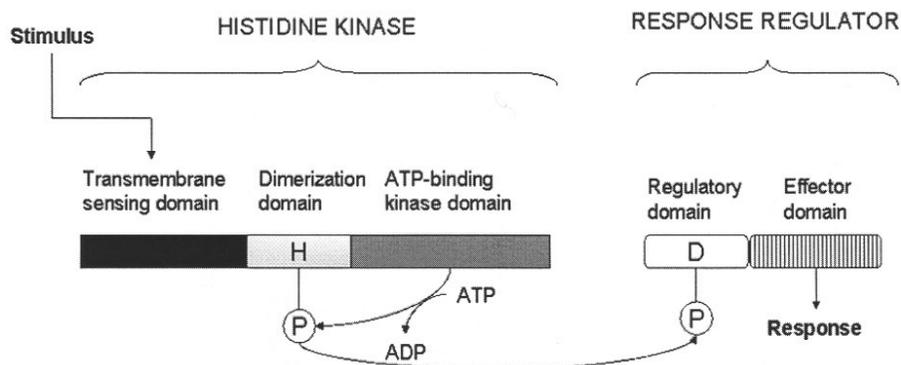


fig. 25 Sistema de transducción de señales de dos componentes

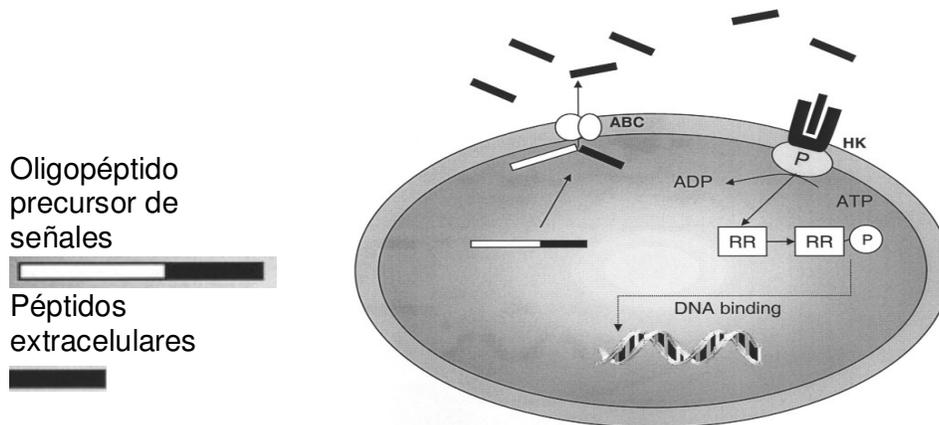


fig. 26 Sistema quórum sensing de bacterias grampositivas. El oligopéptido precursor de señales es procesado y exportado por los transportadores ABC. Cuando el nivel umbral es alcanzado, los péptidos extracelulares se ligan a un receptor histidina quinasa (HK) en la membrana celular, resultando en la fosforilación de el dominio histidina fosfotransferasa. El fosfato (P) es transferido al regulador de respuesta (RR), el cual puede ser ligado al ADN blanco y altera la expresión del gen.

Fuente: Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2004; 15: 4-12 .

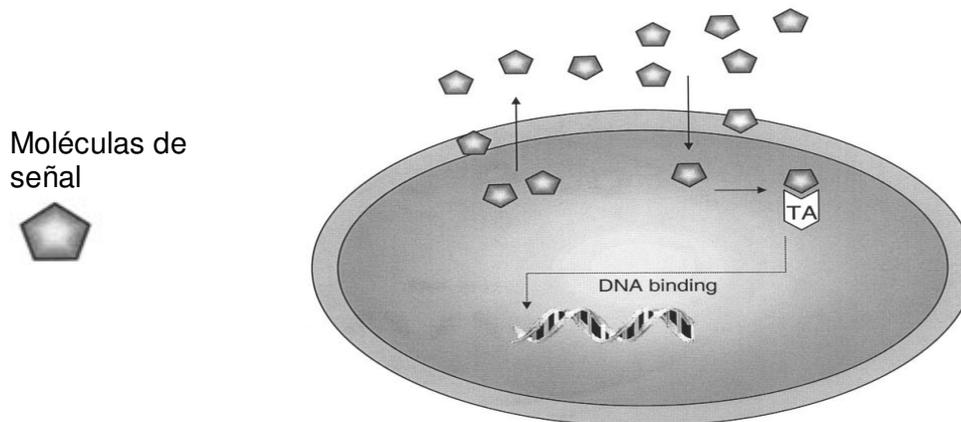


fig. 27 Sistema quórum sensing de bacterias gramnegativas. Las moléculas de señal producidas por las células, se difunden libremente a través de la superficie de la célula. Cuando se alcanza el nivel umbral, las moléculas de señal se unen a un activador transcripcional (TA). La compleja señal TA se une al ADN blanco y altera la expresión del gen.

Fuente: Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2004; 15: 4-12 .

4.6 RECEPTORES BLANCO DE BACTERIOCINAS

La mayoría de las bacteriocinas son activadoras de membrana, causando permeabilización y eventualmente muerte de las bacterias blanco.

Algunos lantibióticos tipo A y tipo B tienden a mostrar la muerte de células blanco, interrumpiendo la síntesis de la pared celular, a través de la alta afinidad vinculada a la molécula de lípido II, la cual juega un rol esencial en la síntesis de la capa de peptidoglucano dentro de la fase I, ya que es considerado un precursor.

Los lantibióticos tipo A son a menudo capaces de matar bacterias por mecanismos adicionales: vinculando la molécula de lípido II y de este modo formando poros en la membrana citoplasmática de la célula blanco, siendo éste último el mecanismo letal. ^(22,25)

4.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Los métodos usuales para la extracción de bacteriocinas son basados en su afinidad a los solventes orgánicos, su variación en solubilidad, en soluciones concentradas de sal y en un determinado pH. La presencia de regiones hidrofóbicas en las moléculas de bacteriocina son esenciales para su actividad antagonista sensible a bacterias, ya que su inactivación depende de su interacción hidrofóbica con la célula bacteriana y sus moléculas. ⁽²²⁾

Las complejas macromoléculas pueden ser disgregadas usando agentes como la urea, ultrafiltración o por la eliminación del material lípidico por extracciones con metanol- cloroformo o etanol- diethyl- éter, mientras que, la purificación se realiza mediante métodos de cromatografía, filtración en gel, interacciones hidrofóbicas y fase reversa de la cromatografía.

5. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Streptococcus mutans* EMPLEADOS EN LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

5.1 VIRULENCIA

La virulencia se define como el grado de patogenicidad y las propiedades que una bacteria posee para ser considerada un patógeno se conocen como factores de virulencia.^(1,9)

Algunos de los factores de virulencia que determinan la colonización y la supervivencia de *S.mutans* en la placa dentobacteriana son: la adherencia, la resistencia ácida, la acidogénesis, la producción de bacteriocinas, situaciones de estrés como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.^(11,23,26)(fig.28)

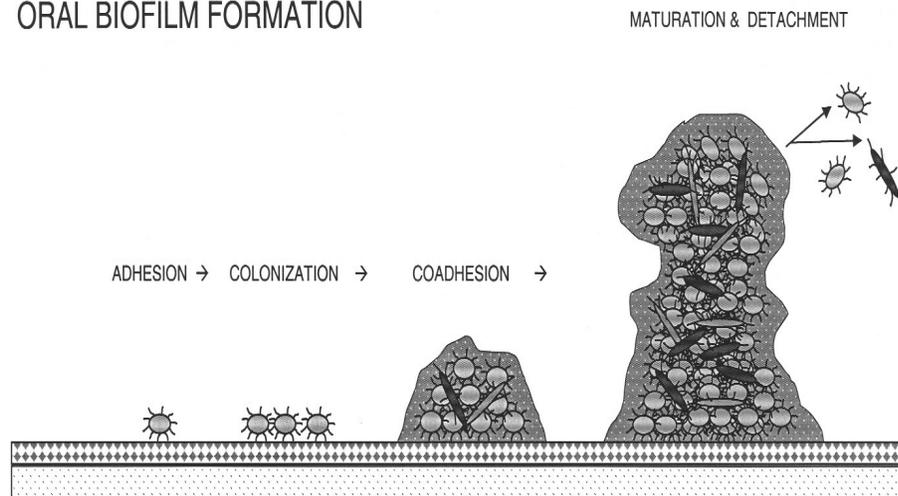
Estudios de los factores de virulencia de *S.mutans* y su correlación con una biodiversidad de especies son fundamentales para entender el rol que juega para colonizar a través de los diferentes genotipos en el mismo individuo, y la expresión de las características que pueden o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones en el ambiente.^(8,11)

La habilidad de la bacteria para sobrevivir y persistir en un determinado ambiente, dependería, en parte, de su inherente plasticidad genética, la cual determina su habilidad para responder a la fluctuación local del ambiente o condiciones de tensión, tales como, la disponibilidad o escasez de nutrientes, el pH ácido y la exposición a ácidos orgánicos.^(4,8,11,23,31)

5.1.1 ADHESIÓN

Diferencias genéticas pueden relacionarse para entablar discrepancias de virulencia entre las cepas de *S. mutans*, siendo una característica importante de estas cepas, en el desarrollo de caries, la habilidad para adherirse firmemente a la superficie del diente en presencia de sacarosa, la cual es mediada principalmente, por la acción enzimática de la GTF- I y la GTF- S (glucosil- transferasa), éstas son consideradas fundamentales para la virulencia de *S.mutans* en la patogénesis de la caries dental. Por lo que, diferencias en la síntesis de glucanos insolubles (mutanos) o en la formación de la biopelícula son asociados con diferentes niveles de virulencia.^(8,11)

a) ORAL BIOFILM FORMATION



b) PROSPECTS FOR FUTURE INTERVENTION

TARGETS:

Surface, Adhesion, Colonization, Coadhesion, Metabolism, Growth, Adaptation, Maturation, Climax community, Detachment

STRATEGIES:

Surface modification, Immunization, Replacement therapy, Two-component and quorum-sensing system interference

Fig. 28 Formación de la biopelícula

Fuente: Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2004; 15: 4-12 .

5.1.2 DEFICIENCIA DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA

Por algunos años, la terapia de reemplazo ha sido considerada como un enfoque atractivo para la prevención de ciertas infecciones microbianas. Con respecto a la patogenicidad en la caries dental, la deficiencia de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) puede ser usada como un acceso para reducir la cariogenicidad en la construcción de la cepa, ya que ésta enzima cataliza la conversión de piruvato en ácido láctico, el cual degrada la superficie del diente. ^(2,6,7,12,16,18,19,20)

Clonando el gen estructural, codificado para la LDH se provee la base para producir clones con deficiencia de esta enzima, lo cual es una mutación letal en la mayoría de las cepas de *S.mutans* debido a que se genera un desequilibrio metabólico, es por esto que para compensar la deficiencia de LDH se inserta una ADH (alcohol deshidrogenasa) suplementaria y como consecuencia la glucólisis produce cantidades significativas de productos finales como etanol y acetona, así como cantidades pequeñas de ácidos. ^(2,3,19,20,21)

5.5 MUTACINAS

Las bacteriocinas producidas por *S.mutans* son conocidas como mutacinas y la frecuencia de sus actividades antimicrobianas fueron reportadas en variaciones de un 11% a 100%. ⁽²⁵⁾

Son péptidos o proteínas antibióticas principalmente bactericidas para otras bacterias de la misma o especies cercanas relacionadas y juegan un importante rol biológico en la regulación y composición de la biopelícula, debido a su actividad sinérgica o antagonista, lo que sugiere que su amplio espectro puede ser más importante en la colonización y estabilización de esta especie cariogénica, principalmente en un nicho

estable de alta y compleja actividad microbiana, lo que les confiere una ventaja ecológica en diversas comunidades bacterianas. ⁽⁸⁾

La mayoría de las bacteriocinas de *S. mutans* caracterizadas hasta ahora, pertenecen al grupo I, los que son conocidos como lantibióticos y algunas cepas producen por lo menos 3 tipos de mutacinas la I, II y III. ^(11,23) Aunque varios tipos diferentes de mutacina son codificados por *S. mutans*, en la mayoría de aislamientos producen un número menor de tipos de mutacina. ⁽¹¹⁾ Éstas tienen una actividad de amplio espectro contra bacterias grampositivas, incluyendo patógenos con una alta resistencia a fármacos, mientras que las mutacinas no lantibióticas son más específicas para especies cercanas como el grupo de *S. mitis* y estreptococos del grupo A. ⁽²⁶⁾ De esto se deduce que la producción de dos mutacinas por una cepa, bajo diferentes condiciones implica que ellos cumplen diferentes roles en la ecología de *S. mutans*. ⁽²⁵⁾

Un estudio de la producción de mutacina en 145 aislamientos de *S. mutans* de niños y sus madres, mostraron que 88% de las cepas produjeron actividad antimicrobiana contra más de 1 a 14 cepas indicadoras, ⁽²⁵⁾ lo que significa que esta actividad puede facilitar la transmisión de especies entre madre e hijo e incrementar la razón de esta especie en el biofilm, contribuyendo al incremento de riesgo a caries. ⁽⁸⁾

La mutacina I es un lantibiótico de 24 aminoácidos con una masa molecular de 2364 Da, mientras que la mutacina II muestra una relación estructural con la lantionina. (fig.29) Por otra parte, dos péptidos clase II, bacteriocina peptídica- mutacina IV, es producida por una cepa de *S. mutans* UA140, una cepa que además produce mutacina I, esta producción parece ser regulada por diferentes mecanismos bajo condiciones fisiológicas diferentes, en este sentido la mutacina I solo es producida por células que crecen bajo condiciones de formación de la biopelícula y en medios sólidos, mientras que la mutacina IV es producida

en cultivos líquidos. Lo anterior depende de la inhibición del gen estructural, es decir, de aquél que codifica la madurez de la bacteriocinas. ⁽²⁵⁾ Se ha demostrado que la producción de mutacina I y mutacina 1140 presentan una dependencia de las condiciones de cultivo, ya que ellas solo pueden ser detectadas después del crecimiento en un medio con agar, se incuba por 72 horas a 37°C. ⁽²³⁾

En el presente, no se conocen los detalles del mecanismo de acción de los lantibióticos de los estreptococos, pero se ha visto que es probable que algunos de estos lantibióticos, como la mutacina I, 1140 y B-Ny266 usan el lípido II como molécula blanco. ⁽²⁵⁾

Una mutacina muy utilizada en las terapias de reemplazo es la 1140, la cual es un lantibiótico de amplio espectro. ^(7,16,18,21) En el año 2000, Hillman y sus colaboradores lanzaron una hipótesis: “Una cepa de *S.mutans* no productora de LDH pero sí de mutacina 1140 podría satisfacer los requisitos para ser una excelente cepa efectora a utilizar en la terapia de reemplazo en la caries dental”. ^(3,7) (fig.30)

Es conocido que el incremento de la producción de mutacina por una cepa particular de *S.mutans* logra que persistentemente colonice la cavidad oral humana. Sin embargo, con el fin de combinar estos rasgos en una cepa genéticamente estable, es necesario determinar la razón de por qué las mutaciones con deficiencia de LDH no pueden realizarse en la mayoría de las cepas de *S.mutans*. ⁽³⁾

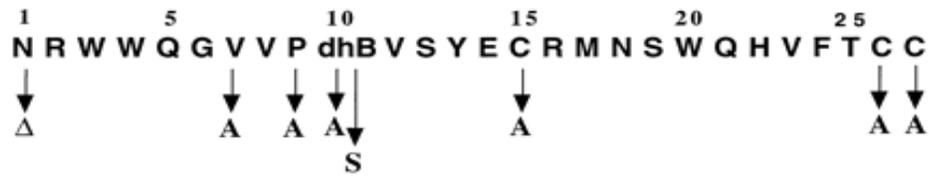


fig. 29 Estructura primaria de un propéptido de la mutacina II y las mutaciones que fueron introducidas. En la posición 10 se muestra un residuo deshidratado.

Chen P, Novak J, Kirk Marion, Barnes S, Qi F, Caufield P. Structure-Activity Study of the Lantibiotic Mutacin II from *Streptococcus mutans* T8 by a Gene Replacement Strategy. *Appl Environ Microbiol* July 1998; 64 (7):2335-2340

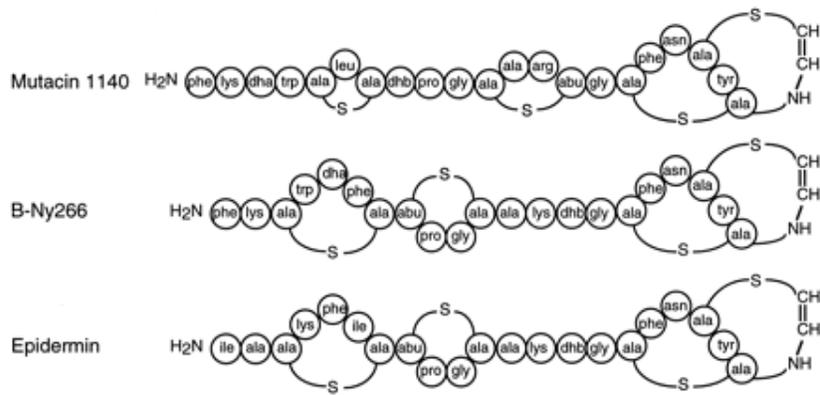


fig. 30 Estructura de la mutacina 1140, en comparación con bacteriocinas de B- Ny266 y epidermin. Abreviaciones: dha, 2,3- didehidroalanina; dhb, 2-3 didehidrobutirine; abu, 2-ácido amino butírico.

Hillman J, Novak J, Sagura E, Gutiérrez J, Brooks T, Crowley P, Hess M, Azizi A, Leung K, Cvitkovitch D, Bleiweis A. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun* 1998; 66:2743-2749

6. CEPA EFECTORA BCS3-L1: EL MEJOR PROTOTIPO PARA LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

En el pasado se han realizado algunas investigaciones dirigidas hacia el aislamiento de cepas efectoras con bajo potencial acidogénico. Entre éstas se incluyen mutantes de *S.mutans* con incapacidad para realizar metabolismo de polisacáridos intracelulares (IPS) y mutantes carentes de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Con este fin se empezaron a seleccionar cepas de *S.mutans* con capacidad de inhibir a otras cepas de la misma especie. Es así como en 1984 se encontró una cepa de *S.mutans*, denominada JH1001, que inhibió el crecimiento de otras cepas de la misma especie.^(3,12) Posteriormente, se evaluó su habilidad para sobreinfectar y persistir en la colonización de la cavidad oral humana, en 5 adultos voluntarios. Todas las cepas de *S.mutans* aisladas de estos pacientes fueron sensibles a la sustancia inhibidora de esta cepa y 3 de los 5 sujetos incluidos en el estudio, después de 3 años, estuvieron persistentemente colonizados por la cepa, logrando ser la cepa de *S.mutans* predominante, constituyendo así, el 50% de los aislamientos en un paciente y el 100% de los aislamientos en el otro (desplazamiento completo de la cepa indígena de *S.mutans*).⁽³⁾

Posteriormente en 1987 se evaluó la colonización en cavidad oral humana de la cepa mutante *S.mutans* JH1005 (proveniente de la cepa JH1001), la cual produjo tres veces más bacteriocina que la cepa pariente JH1001 y poseía una combinación de propiedades necesarias para ser utilizada como cepa de reemplazo, tales como, una baja virulencia y un potencial superior para colonizar.

La infección con la cepa JH1005, utilizando un simple régimen (contrario a lo que se hizo con la cepa JH1001), produjo una colonización persistente

de los dientes en los tres sujetos evaluados. Este es un momento muy importante en el control biológico ya que se obtiene un significativo avance sobre la cepa JH1001, la cual requiere de múltiples aplicaciones para colonizar los dientes de los humanos. En dos de los tres sujetos examinados se obtuvieron reacciones significativas en el número total de *S.mutans*.⁽¹⁹⁾ Además es importante señalar que la colonización de JH1005 no afectó los niveles totales de bacterias y de *S. sanguis* indígena, es decir, se mantiene el equilibrio en el ecosistema oral. Los resultados de estos estudios empiezan a explicar el papel de las bacteriocinas como determinantes claves en la colonización de *S.mutans*.^(3,12,21,22)

La cepa JH1140 es una mutante espontánea de la cepa JH1001 con capacidad de producir de 2 a 3 veces mayor cantidad de mutacina 1140, con relación a la cepa pariente JH1001, esto le dio la capacidad de inhibir el crecimiento de otras cepas de *S.mutans*, promover una colonización más fácil y más rápida que la de la cepa efectora que la produce.^(3,12,21)

También se ha reportado el aislamiento de una muestra clínica de la cepa de *S.mutans* llamada JH1000, el cual tiene buenas propiedades para colonizar, pues produce una potente bacteriocina de amplio espectro, la cual inhibió el crecimiento de cepas representativas de *S.salivarius*, *S.sanguis*, *S.oralis*, *S.mitis*, *S.pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus salivarius*, *L.casei*, *Actinomyces israelí*, *A.naeslundii* y *A.viscosus*. En adición 124 cepas de *S.mutans* examinadas, incluyendo cepas frescas y de laboratorio aisladas son sensibles. Las cepas frescas son las tomadas en el estudio y las de laboratorio, se refieren a cepas indicadoras que compraron para la realización de las pruebas.⁽²¹⁾

La cepa JH1001 y sus derivados tienen propiedades altas de colonización, por ejemplo, la cepa JH1005, se conservó aparentemente por 14 años en algunos sujetos por medio de una sencilla aplicación,

además compitió y excluyó la colonización de otras cepas de *S.mutans*.^(3,12) Sin embargo, el mayor problema con el uso de la cepa JH1001 y sus derivados es que éstas cepas aparecen con un alto poder acidogénico y son por sí mismas cariogénicas.⁽¹²⁾

6.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA EFECTORA BCS3-L1

La cepa de *S.mutans* BCS3-L1 es genéticamente modificada como cepa efectora y es diseñada para el uso de terapia de reemplazo. Fue construida en el año 2000 por Hillman y sus colaboradores por medio de la ingeniería genética, a partir de la cepa *S.mutans* JH1140.^(2,3,16,20)

La tecnología de recombinación de ADN fue usada para suprimir el gen codificado para la LDH en BCS3-L1 haciéndola incapaz de producir ácido láctico y producir elevadas cantidades de una bacteriocina llamada mutacina 1140, la cual da una fuerte ventaja selectiva sobre la mayoría de las otras cepas de *S.mutans*.^(2,7,12,16,18)

No se detecta la actividad de la enzima LDH, lo que induce a elevar el nivel de actividad de la ADH, en relación a su antecesor JH1140 y sus productos finales de la fermentación resultaron neutros: etanol y acetona.^(2,3,20) Sin embargo, es concebible, que la producción de mutacina por BCS3- L1 y los productos resultantes de la fermentación, a causa de la deficiencia de LDH, pueden alterar la ecología de la placa dentobacteriana y producir microorganismos con alto potencial patógeno.

Bajo varias condiciones de cultivo, incluyendo el crecimiento en una variedad de azúcares como la sacarosa, la fructosa, la lactosa, manitol y sorbitol produjo un valor final de pH que es de 0.4 a 1.2 unidades más altas que su antecesor JH1140, esta reducción del potencial acidógeno de BCS3L1 resultó en una gran disminución del potencial cariogénico.^(2,3,12,16)

Se ha mostrado en modelos de ratas gnobióticas y convencionales que BCS3-L1 fue significativamente menos cariogénico que JH1140, lo que brinda una fuerte evidencia para sustentar que la deficiencia de LDH en una cepa de *S.mutans* tiene una reducción significativa del potencial patógeno y de este modo satisface los requisitos para ser utilizada como cepa efectora.^(2,2,12) (fig.31)



fig. 31 En la imagen de la parte superior se muestra una mandíbula de rata con caries y en la imagen de la parte inferior, una mandíbula de rata que recibió tratamiento con terapia de reemplazo.

Fuente: [http:// www.popsci.com/scitech/article/2008-01/germ-could-save- your-life?](http://www.popsci.com/scitech/article/2008-01/germ-could-save-your-life?)

Además, para la prevención de la caries dental, BCS3-L1, debe ser genéticamente estable, ya que suficiente mutacina 1140 que no sea purificada es tóxica. Sin embargo, el prototipo de antibiótico nisina, tiene una baja toxicidad y ha sido usada por décadas como un conservador en la comida, siendo reconocida como segura.^(2,22,24)

La mutacina 1140 producida por las cepas de *S.mutans* eliminó a las cepas indígenas sensibles, pero no tuvo un efecto en las cepas indígenas de *S.oralis* que tienen igual sensibilidad a la muerte por mutacinas *in vitro*. Este resultado indicó que *S.mutans* tiene un hábitat físicamente distinto que es separado de *S.oralis* por una distancia suficiente, para diluir y así reducir la concentración de mutacina abajo de la concentración mínima inhibitoria.⁽²⁾ Por lo tanto, una alta producción de mutacina 1140

claramente proporciona una selectiva ventaja para la colonización de BCS3-L1. Sin embargo, la mínima dosis infecciosa no ha sido determinada para esta cepa o alguna cepa de *S. mutans* en humanos.⁽³⁾ Además, el reducido potencial patógeno de la cepa probiótica BCS3-L1, su alto potencial de colonización y su estabilidad genética, sostienen la idea de que puede ser usada como cepa efectora para la terapia de reemplazo en poblaciones de alto riesgo para esta enfermedad.^(3,12,16)

6.3 CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA

Una cepa de *S. mutans* que combine la deficiencia de LDH y la producción de mutacina 1140 debería satisfacer los prerequisites para ser considerada como una cepa efectora en las terapias de reemplazo.^(19,16) Sin embargo, los métodos genéticos y fisiológicos, claramente establecen el hecho de que la deficiencia de LDH es letal en las cepas de *S. mutans* examinadas, incluyendo la JH1140, probablemente debido a la acumulación de intermediarios tóxicos o al desequilibrio de NAD-NADH. Este efecto letal puede ser superado si se aumenta la actividad de la alcohol deshidrogenasa de una cepa indígena de *S. mutans* por medio de la clonación de un gen de *Zymomonas mobilis* (gen *adhB*).^(3,12,16,20) Es así como BCS3-L1 combina la deficiencia de LDH con la producción de mutacina 1140, siendo genéticamente estable y con un efecto a largo plazo en la salud general del hospedero.

Un defecto en la vía de síntesis del ácido láctico, debido a la deficiencia en la codificación de la LDH en la cepa JH1140, fue introducido por técnicas de recombinación de ADN, en donde una actividad auxiliar de ADH de *Z. mobilis* fue simultáneamente introducida para superar este problema. Para llevar a cabo esto, la clonación del marco de lectura abierta *ldh* (ORF) de *S. mutans* se encuentra en el plásmido pBR322; el fragmento de este plásmido (p10-5) fue suprimido por el círculo de la mutagénesis de la PCR. Solo las primeras 28 bases, incluyendo la

translación (AGT) del codón inicial y las últimas 9 bases previas a la translación del codón final (TAA) fueron retenidas. El fragmento p10-5 y el fragmento *adh* son ligados y transformados dentro de *E. coli* DH5 α , los transformantes resultantes fueron seleccionados en placas con LB conteniendo ampicilina.

Las enzimas de restricción y la secuencia en el análisis son usadas para confirmar el tamaño (9.0 kbp) y así proporcionar la orientación para insertarlos en un plásmido, el pTB1000, el cual tiene el gen *adh* de *Z.mobilis* y el marco de lectura abierta *ldh*. Esta recombinación de ORF fueron subclonadas dentro del plásmido p95 para crear un vector suicida, lo que produjo la construcción de un plásmido final pTB1002. Finalmente la transformación de JH1140 con pTB1002 produjo la cepa BCS3-L1. ^(3,20) (fig.31)

El metabolismo en BCS3-L1 distribuye el carbono de manera diferente sobre conocidas rutas catabólicas y su estabilidad genética puede ser valorada *in vitro*, además produce colonias rojas cuando crece en el medio de cultivo glucosa- tetrazolium, mientras que las cepas salvajes de *S.mutans*, incluyendo JH1140, producen colonias blancas en este medio. La reversión por transformación es también improbable, desde la cepa JH1000 y sus derivados, porque bajo óptimas condiciones son pobremente transformables.

La construcción de la cepa empleando la inserción de un vector suicida, pTB1002, es una estrategia necesaria porque la transformación con el ADN lineal no ha sido alcanzada en JH1001 o en sus derivados. En adición para la eliminación del gen de tipo salvaje, esta estrategia tiene la ventaja adicional de eliminar todo el vector de ADN, incluyendo los genes de resistencia antibiótica. ⁽²⁰⁾

La cepa BCS3-L1 crece bien en una variedad de fuentes de carbono y las concentraciones de formato, acetato y acetona son significativamente más elevadas en relación con JH1140, lo cual indica el incremento en la desasimilación del piruvato por las vías de la piruvato deshidrogenasa y la piruvato- formato liasa. Estos productos finales son comunes en una variedad de microorganismos, incluyendo *S. mutans* cuando crece en una limitada cantidad de sustrato y no se han observado efectos tóxicos.^(3,20)

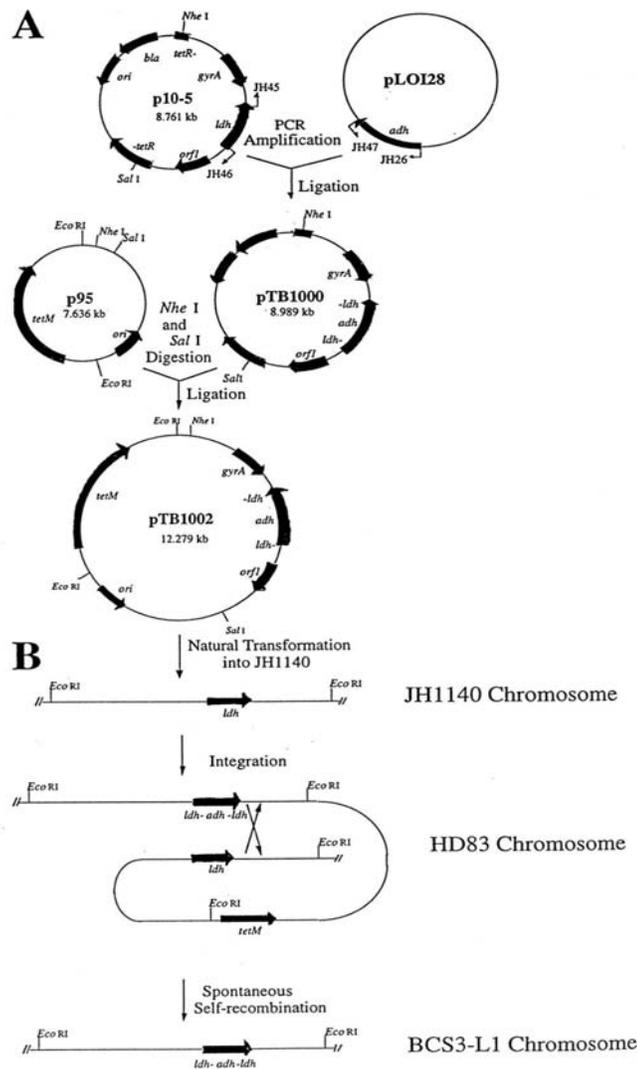


Fig. 31 Construcción de la cepa BCS3-L1

Fuente: Hillman J, Brooks T, Michalek S, Harmon C, Snoep J, van der Weijden C. Construction and Characterization of an Effector Strain of *Streptococcus mutans* for Replacement Therapy of Dental Caries. Infect. Immun 2000; 68: 543-549.

6.4 APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TERAPIAS DE REEMPLAZO

Las terapias de reemplazo son utilizadas en estudios pilotos para el control de otitis media, caries dental, enfermedad periodontal, enfermedades del tracto urogenital, infecciones por *S.pyogenes* y *S.aureus*. (fig. 32) Además se han utilizado probióticos en la industria alimenticia con la finalidad de fortalecer la flora intestinal y reemplazar a las bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales. ^(2,12,22,24)

Enfermedad	Cepas efectoras	Agente inhibitorio	Investigador
Caries Dental	<i>S. mutans</i> JH1000 y sus derivados	Mutacina 1140	Hillman
	<i>L. rhamnosus</i> GG	No definida	Nase
	<i>S. equi subespecies zooepidemicus</i>	Zoocin A	Simmonds
	<i>S. salivarius</i> TOVE-R	No definida	Kurasz
	<i>E. faecalis</i>	Bacteriocina	Gilmore
Otitis media	Mezcla de <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> y <i>S. oralis</i>	No definida	Roos, Tano
Faringitis estreptocócica	<i>S. salivarius</i> K12	Salivaricins A2 y B	Tagg
	Mezcla de <i>S. sanguis</i> y <i>S. mitis</i>	No definida	Roos

fig.32 Cepas efectoras de uso médico

Fuente: Tagg JR, Dierksen KP. Bacterial replacement therapy: adapting "germ warfare" to infection prevention. Trends Biotechnol 2003; 21(5):217-23.

Se han realizado preparaciones que contienen bacteriocinas para el control de la faringitis estreptocócica y para mantener la salud de la garganta, evitando así posibles invasiones. Esto ha hecho que las terapias de reemplazo se vuelvan un tratamiento preventivo y curativo en infecciones donde la resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado. ⁽¹²⁾ (fig. 33)



fig. 33 Probiótico que contiene la bacteriocina Salivaricins A2 y B utilizado en la faringitis estreptocócica

Fuente: Tagg JR, Dierksen KP. Bacterial replacement therapy: adapting "germ warfare" to infection prevention. Trends Biotechnol 2003; 21(5):217-23.

En el plano odontológico, el Dr. Jeffrey Hillman ha estudiado por casi 30 años, las aplicaciones clínicas de las terapias de reemplazo en la prevención y control de la caries, así como en la enfermedad periodontal y, recientemente, tecnología para la prevención y control del cáncer, ya que desde 1998 obtuvo el permiso de la FDA para realizar investigaciones clínicas. (fig.34) Es así como funda una compañía, ORAGENICS, que desde su sede en Florida, pretende comercializar productos basados en las terapias de reemplazo y crear tecnología que promueva la salud de los seres humanos. ^(7,18,19) (fig. 35)

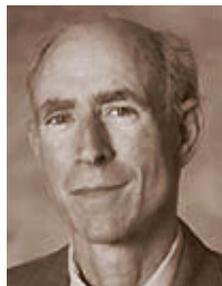


fig. 34 Dr. Jeffrey Hillman

Fuente: <http://www.oragenics.com>



ORAGENICS

fig.35 Logotipo de la compañía ORAGENICS

Fuente: <http://www.oragenics.com>

Los productos que ha creado la compañía ORAGENICS son:

- TERAPIA DE REEMPLAZO (SMaRT Replacement Therapy™): Consiste en la aplicación de una cepa de *S.mutans* modificada que produzca mutacina 1140, para matar a la cepa cariogénica de *S.mutans* de la cavidad oral y en consecuencia reducir el riesgo a caries, además no produce ácido láctico. Su aplicación se realizará a través de una composición farmacéutica por el odontólogo en el consultorio dental, su administración consistirá en frotar la cepa en la superficie de los dientes del paciente con un cotonete o hisopo, una sola aplicación dará protección por un largo tiempo. ^(7,18)

La aplicación de este nuevo producto fue aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) el 30 de noviembre del 2004 y ORAGENICS está realizando en el 2008 las pruebas clínicas correspondientes.

- MU 1140™: Se trata de la mutacina 1140, la cual fue descubierta a partir de las investigaciones para crear cepas efectoras en las terapias de reemplazo, ya que se ha probado su actividad antagonista contra bacterias grampositivas y algunas bacterias gramnegativas de importancia médica. Se podrá utilizar como un novedoso antibiótico, debido a la alta resistencia microbiana a los antibióticos convencionales. ^(7,18)

Se espera que en este 2008 la FDA otorgue su aprobación y actualmente continúan las investigaciones clínicas de este producto.

- Probiora 3™ TRATAMIENTO PROBIÓTICO ORAL: Emplea bacterias benéficas que promueven la salud oral y periodontal, tales como *S.uberis*, *S.oralis* y *S.rattus*; los dos primeros, ayudan al equilibrio de la microbiota y al mantenimiento de los tejidos periodontales, el último disminuye el número de *S.mutans* por competición de nutrientes. Se completó un estudio en humanos en noviembre del 2006 y el producto consiste en un enjuague oral. ^(7,18)
(fig.36)

Durante el tercer cuarto del año 2007, ORAGENICS inició las negociaciones para la venta y la licencia de esta tecnología, en este 2008 continúan las gestiones. (fig.37)

Se espera que para el año 2009 o 2010 todos los productos sean comercializados y se disminuyan así, los gastos que ocasionan tratamientos prolongados.(fig.38)



fig.36 Enjuague probiótico

Fuente: [http:// www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman](http://www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman)



Fig. 37 Compañía ORAGENICS

Fuente: <http://www.oragenics.com>

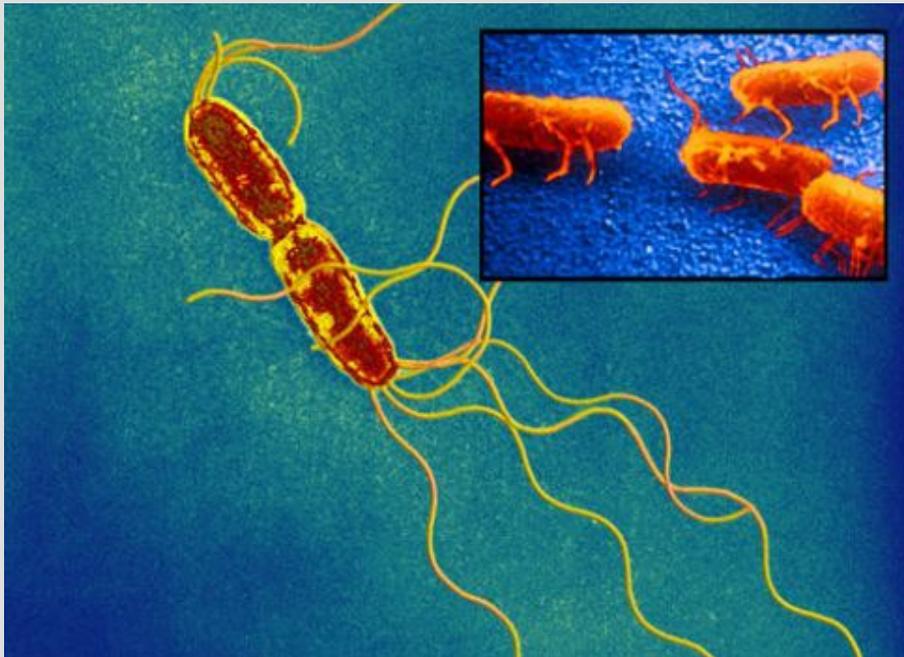
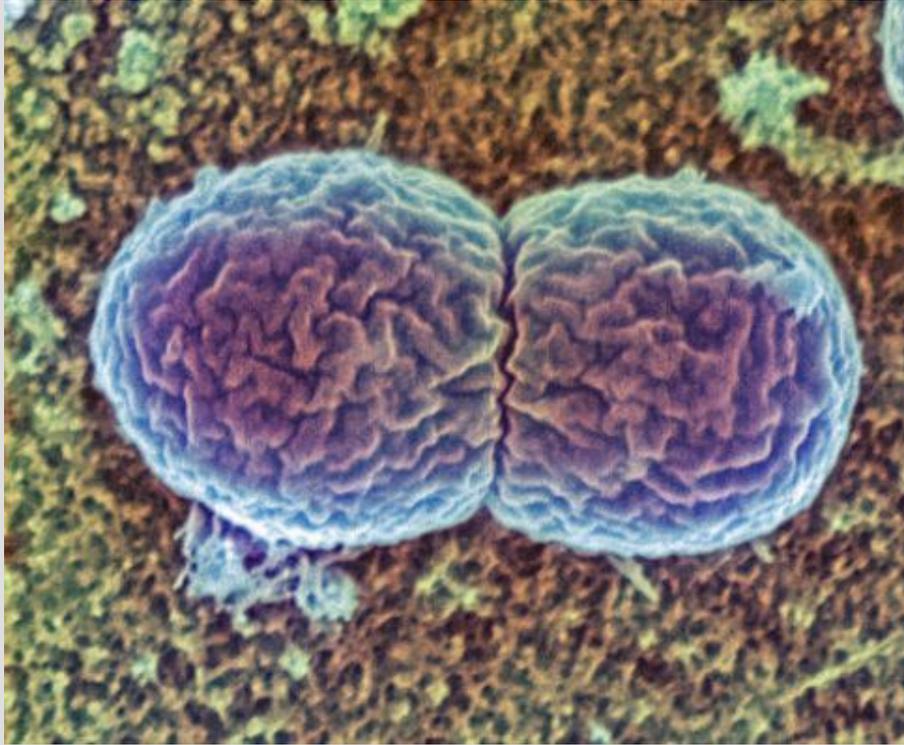


Fig.38 En la parte superior se muestra un probiótico utilizado para combatir la enfermedad de Chron por medio de la modificación de un queso elaborado por *Lactococcus lactis* bacteria.

En la parte inferior se muestra la bacteria *Salmonella*, la cual reciente investigaciones indican que produce una toxina contra el cáncer.

Fuente: [http:// www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman](http://www.popsci.com/category/tags/jeffrey-hillman)

CONCLUSIONES

Las terapias de reemplazo han sido consideradas como una alternativa ante la gran resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Sin embargo, en la construcción de cepas efectoras se requiere el cumplimiento de diversos parámetros con la finalidad de evitar implicaciones ecológicas importantes que ocasionarían inseguridad para el ser humano y por lo tanto, hacerlo susceptible a otras enfermedades.

La importancia de la utilización de nuevas tecnologías, permitirá en el futuro, una prevención adecuada de las enfermedades infecciosas y optimizarán la salud general del individuo. En el caso particular de la caries dental, se logrará un mejor control microbiológico de la biota oral, una protección prolongada, no existe propensión a efectos secundarios, productos comerciales de sencilla aplicación, rápida acción y costos accesibles, educación sencilla al paciente por medio de regímenes de higiene oral convencionales, lo que hará una Odontología más preventiva que restaurativa, más accesible que incosteable, pues se evitarán tratamientos tan costos y recidivas, lo cual no indica que estas terapias, pretendan suplir las visitas odontológicas, más aún, promueven una opción para controlar una enfermedad de índole multifactorial; en la cual, es sabido que cualquier desequilibrio entre la microbiota, el sustrato, el hospedero y el tiempo, pueden ser desencadenantes para originar la caries dental, en adición, se considera una enfermedad infectocontagiosa por lo que todos estamos expuestos a adquirirla en algún momento de nuestra vida.

Ante la gran prevalencia de la caries, la aplicación de la ingeniería genética permitirá un control más específico de la enfermedad y un campo abierto a nuevas investigaciones que eviten las grandes consecuencias de esta enfermedad que veces son minorizadas o desconocidas tales como septicemias, infecciones y hasta endocarditis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liébana J. Microbiología oral. 2^a. ed. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2002.
2. Anusavice K. Present and future approaches for the control of caries. J Dent Educ 2005; 69(5): 538-554.
3. Gamboa F, Herazo B. Control microbiológico de *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. Universitas Scientiarum 2004; 9:45-55.
4. Li, Y. H, P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J. Bacteriol 2001; 183:897-908.
5. Wang B, Kuramitsu H. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. Appl. Environ. Microbiol 2005; 71:354-362.
6. Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?. Crit. Rev. Oral Biol. Med 2004; 15: 4-12 .
7. Walsh, N. Tackling Tooth. Office of research Publications, Special Advertising Report. Summer 2004; 20-24.
8. Napimoga M, Höfling J. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J of Oral Science 2005; 47(2): 59-64.

9. Slots J, Taubman M. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1a.ed. St Louis USA Mosby Yearbook, 1992.
10. Samaranayake, L. Essential Microbiology for Dentistry. 3a.ed. China: Churchill Livingstone, 2006.
11. Chong P, Drake L, Biswas I. LiaS Regulates Virulence Factor Expression in *Streptococcus mutans*. Infect. Immun 2008; 76: 3093-3099.
12. Tagg J, Dierksen K. Bacterial replacement therapy: adapting "germ warfare" to infection prevention. Trends Biotechnol 2003; 21(5):217–23.
13. Foster J, Kolenbrander P. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. Microbiol Mol Biol Rev Sep 2002; 66 (3):486-505.
14. Eglund, P, Palmer R, Kolenbrander P. Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*–*Veillonella atypica* biofilms: Signaling in flow conditions requires juxtaposition. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(48): 16917-22.
15. Kuramitsu H, He X, Lux R, Anderson M, Shi W. Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. Microbiol. Mol. Biol. Rev 2007; 71: 653-670.
16. Hillman J, Mo J, McDonell E, Cvitkovitch D, Hillman CH. Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. J Appl Microbiol May 2007;102(5):1209-19.

17. Ruby J, Morris G. Nature of Symbiosis in Oral Disease. *J Dent Res* 2007; 86 (1):8-11.
18. [http:// www.oragenics.com](http://www.oragenics.com)
19. Pollack A. Bacteria Enlisted for New Trials on Dental Health. *New York Times*. November 30, 2004.
20. Hillman J, Brooks T, Michalek S, Harmon C, Snoep J, van der Weijden C. Construction and Characterization of an Effector Strain of *Streptococcus mutans* for Replacement Therapy of Dental Caries. *Infect. Immun* 2000; 68: 543-549.
21. Hillman J, Novak J, Sagura E, Gutiérrez J, Brooks T, Crowley P, Hess M, Azizi A, Leung K, Cvitkovitch D, Bleiweis A. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun* 1998; 66:2743-2749.
22. Parada J, Ricoy C, Bianchi A, Soccol C. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives *Braz. arch. biol. technol* May 2007; 50 (3).
23. van der Ploeg J. Regulation of Bacteriocin Production in *Streptococcus mutans* by the Quorum-Sensing System Required for Development of Genetic Competence. *J. Bacteriol* 2005; 187: 3980-3989.
24. González B, Gómez M, Jiménez Z. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN* Vol 4 No.2 Abril-Junio 2003. <http://www.respyn.uanl.mx/index.html>

25. Nes I, Diep D, Holo H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol* 2007; 189: 1189-1198.
26. Phoebe T, Phoebe M. Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. *Microbiology* 2005; 151: 3947-3955.
27. Muñoz J. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. http://www.microbiología.org.mx/microbios_en_línea/cap.03/capítulo03.pdf
28. Arif N, Sheehy E. Diversity of *Veillonella* spp. from Sound and Carious Sites in Children. *J Dent Res* 2008; 87(3):278-282
29. Negroni M. *Microbiología estomatológica*. 1ª edición, México, Editorial Panamericana; 1999.
30. Syvitski R, Tian X.-L, Sampara K, Salman A, Lee S, Jakeman D, Li Y. Structure-Activity Analysis of Quorum-Sensing Signaling Peptides from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol* 2007; 189: 1441-1450
31. Biswas I, Drake L, Erkina D, Biswas S. Involvement of Sensor Kinases in the Stress Tolerance Response of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol* 2008; 190: 68-77
32. <http://www.popsci.com/scitech/article/2008-01/germ-could-save-your-life?>
33. http://www.microbelibrary.org/asmonly/details_print.asp?id=1986
34. <http://www.yourreturn.org/Treatments/Teeth/index.htm>

35. [http:// www.popsi.com/category/tags/jeffrey-hillman](http://www.popsi.com/category/tags/jeffrey-hillman)
36. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>
37. http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adnrecombinante/comocortar_y_pegar_el_adn_tij.php
38. <http://www.juntadeandalucia.es/.../viginsercion.html>
39. [http:// www.unileon.es/index.php?elementoID=1615](http://www.unileon.es/index.php?elementoID=1615)
40. <http://www.terapiagenica.es/wordpress/wpcontent/uploads/2008/02/microinyeccion.jpg>
41. <http://www.gigicabrini.it/farmacia/fprodotti/nisina.html>
42. Widemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers O, Bierbaum G, Kruijff B, Sahl H. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Molecular Microbiology* 2006; 61 (2): 285-296.

ANEXO

GLOSARIO

ADHESIÓN: Es el fenómeno de unión que se establece en los microorganismos y los tejidos del hospedador.

ANABOLISMO: Representa aquellas reacciones que tiene por objeto la síntesis de materiales constitutivos de las bacterias, así como de otros que pueden eliminarse al exterior.

BACTERIOCINA: Proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora, pueden ser consideradas como tóxicas.

BIBLIOTECA GÉNÉTICA: Colección de miles o millones fragmentos de restricción.

CARIES: Según la OMS, se puede definir como proceso patológico, localizado, de origen externo, que se inicia tras la erupción y que determina un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad.

CATABOLISMO: Son las reacciones químicas llevadas a cabo por los seres vivos con la finalidad de hacer nutrientes.

CLON: (del griego *klon* = retoño): Grupo de células o individuos originados de un solo progenitor, por reproducción asexual o por manipulación biotecnológica.

CLONACIÓN: En la tecnología de ADN recombinante, los procedimientos para la manipulación del ADN que permiten la producción de múltiples copias de un gen o segmento de ADN se conocen como "clonación del ADN". El proceso de producción asexual de un grupo de células u organismos (clones), genéticamente idénticos.

CÓDIGO GENÉTICO: Las secuencias de nucleótidos (tripletes) que representan a los aminoácidos a introducir en una molécula durante la síntesis proteica. La secuencia de nucleótidos del ADN puede utilizarse para predecir la secuencia del ARNm y por ende la secuencia de aminoácidos.

COLONIZACIÓN: Consiste en el establecimiento microbiano en la superficie o el interior del hospedador.

COMENSALISMO: Es la relación entre dos organismos en la cual, solo hay beneficio para uno, pero el otro no se perjudica.

CONJUGACIÓN: Es el fenómeno de transferencia de material genético entre dos bacterias por contacto directo entre ambas.

DELECIÓN: Pérdida de un segmento cromosómico sin que se altere el número de los mismos.

DOSIS INFECCIOSA: Es la cantidad de bacterias necesarias para causar una alteración en la fisiología normal del individuo.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN: Es una endonucleasa que corta el ADN en un sitio de reconocimiento específico, generalmente compuesto de cuatro a seis pares de bases. Estas enzimas van leyendo la cadena de ADN hasta encontrar la secuencia que reconocen y, si está presente, lo rompen originando lo que se conoce como fragmentos de restricción.

ESTABILIDAD GENÉTICA: Habilidad de los microorganismos para no sufrir cambios genéticos en un ambiente que sufre cambios constantes.

EXTREMOS COHESIVOS: Son aquéllos que se producen cuando se realiza la escisión del ADN con enzimas de restricción y que tienen la capacidad de ligarse con otro final complementario por medio de enzimas ligasas.

FEROMONA: Sustancia química secretada por un individuo, con el fin de provocar un comportamiento determinado en otro individuo, por medio de señales.

FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN: Son los fragmentos producidos por el corte de las enzimas de restricción en el genoma de cualquier organismo.

FUERZA MOTRIZ DE PROTONES: Estado energético de una membrana, creada por la expulsión de protones a través de la acción de una cadena transportadora de electrones.

GENOMA: Todo el material genético de los cromosomas de un organismo en particular, su tamaño se da generalmente como el número total de pares de bases.

LABORATORIO NACIONAL LOS ÁLAMOS: Es un laboratorio del Departamento de Energía de los Estados Unidos, administrado por la Universidad de California, que se encuentra en los Álamos, Nuevo México, siendo una de las instituciones multidisciplinarias de investigación más grandes del mundo.

LÍPIDO II: Molécula considerada precursora en la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana y es el blanco de acción de la mayoría de las bacteriocinas.

MEDIO DE CULTIVO: Son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos.

METABOLISMO BACTERIANO: Conjunto de reacciones químicas mediante las cuales las bacterias se nutren y aseguran su supervivencia por medio de la reproducción.

MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE: Combinación de moléculas de ADN de diferentes orígenes que se unen por medio de la tecnología del ADN recombinante.

MUTACINA: Bacteriocina producida por *S.mutans*.

MUTACIÓN: Es cualquier cambio de bases de todo ADN persistente en la célula sin la incorporación de un ADN extraño del ambiente, de otra bacteria o de un bacteriófago.

MUTANTES: Son aquellos microorganismos que han sufrido una determinada mutación.

MUTUALISMO: Es la relación de dos organismos en la cual, obtienen un beneficio para ambos.

NISINA: Bacteriocina perteneciente a la clase I, los lantibióticos; no es tóxica en el ser humano y es utilizada en productos lácteos.

PATOGENICIDAD: Es una relación que tiene como consecuencia un perjuicio para el hospedador, que se manifiesta en forma de enfermedad.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PLÁSMIDOS: Son elementos facultativos y están constituidos por ADN bicatenario, superenrollado, circular sin extremos libres, de tamaño significativamente menor que el cromosoma.

QUÓRUM SENSING: Mecanismo por el cual la bacteria produce y detecta moléculas difusoras de señales y regula la expresión de los genes.

SIMBIOSIS: asociación entre dos organismos distintos.

SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: Mecanismo por el cual la bacteria percibe y responde a los estímulos externos.

TRANSDUCCIÓN: Es la transferencia de ADN inducida por fagos, bacteriófagos o virus bacterianos.

TRANSFERENCIA DE GENES: Es la entrada de un ADN extraño en una bacteria procedente de su entorno.

TRANSFORMACIÓN: Es el fenómeno de transferencia genética por medio del cual, una bacteria es capaz, sin ningún intermediario, de incorporar un ADN exógeno.

TRANSPOSONES: Son fragmentos de ADN no autónomos, ya que siempre tienen que estar integrados en otro ADN, bien sea el cromosoma bacteriano o bien en un plásmido. Presentan gran movilidad dentro de ellos, por ello reciben el nombre de genes saltarines.

TOXINA BACTERIANA: Es un compuesto estructural o elaborado específicamente por las bacterias que interactúa con moléculas del hospedador causando daños celulares y la interrupción de funciones fisiológicas.

VECTOR DE CLONACIÓN: (del latín *vehere* = transportar) Molécula de ADN originada en un virus, plásmido, o en la célula de un organismo superior en el que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autoreplicación. Los "vectores" introducen ADN extraño en una célula huésped, donde puede reproducirse en grandes cantidades. A menudo los vectores son moléculas de ADN recombinante que contienen secuencias de diferentes vectores.

VIRULENCIA: Grado de patogenicidad.