



Estudio del comportamiento de cepas autóctonas de *Streptococcus Mutans* en diferentes localizaciones de la caries dental

María Alejandra Bojanich.

Tesis - Doctor en Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias
Médicas. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud, 2013

Aprobada: 9 de agosto de 2013.

Registrado al Folio 9 del libro de Grados N°37 (Res. 3049/13 HCD)

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Estudio del comportamiento de cepas autóctonas de *Streptococcus Mutans* en diferentes localizaciones de la caries dental by María Alejandra Bojanich is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

DIRECTORA

Prof. Dra. Reyna Olga Calderón

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Prof. Dra. Lila Susana Cornejo

Prof. Dra. Diana Teresa Masih

Prof. Dra. Reyna Olga Calderón

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICA NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”

***A Fernando, Leonardo y Lucía
por estar siempre a mi lado, por brindarme amor y
comprensión en el camino transitado.***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora Prof. Dra. Olga Calderón por su profesionalidad, su constante guía, su apoyo personal y científico, educándome en la perseverancia y en el saber diario. Gracias.

Agradezco a los miembros de mi Comisión de Seguimiento de Tesis, Dra Lila Susana Cornejo y Dra Diana Teresa Masih por aportar ideas mejoradoras durante la realización de esta Tesis.

Agradezco a la directora del Instituto de Biología Celular de la FCM, Dra. Mirta Valentich, por permitirme realizar mis investigaciones en el espacio de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología.

Agradezco a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme realizar la Carrera de Doctorado.

Agradezco a todos mis compañeros del Instituto de Biología Celular: Ernesto Grasso, Eugenia Pasqualini, Patricia Quiroga, Gastón Repossi, Andrea Comba, Marianela Vara, Fernanda Triquell, Cintia Diaz; Elio Soria, Yanet Alvarez, Ale Berra y Sonia Muñoz por hacerme sentir uno de ellos y por su ayuda desinteresada siempre que lo necesité.

Agradezco al Dr. Bruno Maggio y a los miembros de su laboratorio por la ayuda prestada.

Agradezco a la Dra. Mabel Brunotto por brindarme sus conocimientos en forma incondicional y generosa.

Agradezco a la Dra. Od. María Cecilia Martinez, quien me ayudó en la recolección de las muestras bucodentales.

Agradezco a mis compañeros de la Cátedra de Química Biológica "A": Dr. Rubén Hugo Ponce, Dra. Raquel Vivian Gallará y Dra. Viviana Andrea Centeno quienes me apoyaron constantemente en la última etapa de la Carrera de Doctorado. Muchas gracias.

Agradezco a Aída Monterisi, amiga de siempre, quien me enseñó los primeros pasos en la metodología de la investigación.

Agradezco a mi esposo Fernando, compañero de vida, quien me brindó su apoyo y con su gran amor compartió los momentos más difíciles durante este trabajo.

Agradezco a mis hijos Leonardo y Lucía, a quienes quiero sin medida, que me ayudaron de muchas maneras, brindándome fuerzas en todo momento y soportaron mis ausencias.

Agradezco a mis padres Ofelia y Antonio, quienes me inculcaron, con su ejemplo, la responsabilidad por el estudio y el trabajo y por estar siempre presentes en mi vida.

Agradezco a María Eugenia Alvarez, quien cuidó de mis hijos en los momentos de trabajo.

Quiero agradecer a todos los profesionales y amigos que haya olvidado mencionar y que de alguna u otra manera me ayudaron en la realización de esta Tesis Doctoral.

Deseo expresar un profundo agradecimiento a Dios, por todo aquello que recibí, por sentirlo a mi lado y saber que es así.

INDICE GENERAL

RESUMEN	10
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	16
1.1 Caries dental	18
1.2 Mecanismos de producción de la caries dental	18
1.3 Biopelícula Dental	19
1.3.1 <i>Formación de la película adquirida</i>	20
1.3.2 <i>Transporte bacteriano a la película adquirida</i>	20
1.3.3 <i>Estructura general de la Biopelícula Dental</i>	21
1.3.4 <i>Cariogenicidad de la Biopelícula Dental</i>	22
1.4 <i>Streptococcus</i> grupo <i>mutans</i>	23
1.5 <i>Streptococcus mutans</i>	24
1.6 Pared y membrana bacteriana	25
1.7 Acidos grasos de la membrana bacteriana y su relación con la caries dental	25
1.8 Acidez de la biopelícula dental y su relación con la ATPasa	29
1.9 HIPOTESIS	31
1.10 OBJETIVO GENERAL	31
1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIALES y MÉTODOS	33
2.1 Cepas Bacterianas	34
2.2 Procesamiento de las muestras	35
2.3 Aislamiento e identificación de los <i>Streptococcus</i> grupo <i>mutans</i>	35
2.3.1 <i>Pruebas utilizadas para la identificación bioquímica de las cepas</i>	37
2.4 Preparación de las suspensiones bacterianas de trabajo	39
2.5 Determinación de proteínas totales	40
2.6 Extracción de la fracción de membrana del <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	40
2.7 Extracción de ácidos grasos de membrana microbiológica de <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	41

2.8 Determinación de los ácidos grasos extraídos de membrana de <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	41
2.9 Determinación de parámetros estructurales de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>.....	42
2.10 Determinación de Fosfolípidos totales de membrana del <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	44
2.11 Determinación del pH y sobrevida ácida de <i>Streptococcus mutans</i>.....	44
2.12 Actividad F- ATPasa y P-ATPasa de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>	45
2.13 Análisis estadísticos	46
RESULTADOS.....	47
3.1 Composición de ácidos grasos extraídos de membrana de cepas autóctonas de <i>Streptococcus mutans</i>	48
3.2 Determinación de parámetros estructurales de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>.....	53
3.3 Fosfolípidos totales de membrana de <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	59
3.4 pH en suspensiones bacterianas de <i>Streptococcus mutans</i>.....	60
3.5 Sobrevida ácida de <i>Streptococcus mutans</i>	63
3.6 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>	65
3.6.1 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana en microorganismos provenientes de superficie lisa.....	65
3.6.2 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana en microorganismos provenientes de superficie oclusal	66
3.7 Resumen de los diferentes parámetros analizados de <i>Streptococcus mutans</i> provenientes de superficies cariadas.....	68
DISCUSIÓN	69
4.1 Composición de ácidos grasos extraídos de membrana de cepas autóctonas de <i>Streptococcus mutans</i>	70
4.2 Parámetros estructurales de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>	72

4.3 Fosfolípidos totales de membrana de <i>Streptococcus mutans</i> crecidos a pH 7 y 5	76
4.4 Sobrevida ácida y pH en suspensiones bacterianas de <i>Streptococcus mutans</i>	77
4.5 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana de <i>Streptococcus mutans</i>	79
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS.....	88
ANEXOS	98

RESUMEN

El *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es considerado como uno de los principales agentes etiológicos en el desarrollo de la caries dental en humanos. Una de las características que contribuye a la patogenicidad de este microorganismo es su capacidad para metabolizar azúcares fermentables y, como consecuencia, producir diversos ácidos orgánicos que disminuyen el pH del medio circundante.

Con el tiempo la caída del pH produce la desmineralización del elemento dentario y el desarrollo de la caries. Estos microorganismos poseen factores de virulencia (sobrevida ácida y actividad de la ATPasa protónica) que los capacita para sobrevivir en ambientes de pH bajo y además les proporcionan ventajas de supervivencia sobre otras bacterias habituales del ecosistema oral.

Existen estudios de *S. mutans* con cepas de colección, que indican que estos microorganismos varían el número de dobles enlaces y la longitud de las cadenas de los ácidos grasos de su membrana citoplasmática en respuesta al ambiente ácido. Este trabajo de Tesis aporta evidencias de cómo diferentes superficies dentales cariadas de una misma cavidad oral, pueden afectar la respuesta al ambiente ácido de cepas autóctonas de *S. mutans*, llevando al microorganismo a cambiar la composición en ácidos grasos de su membrana, la supervivencia ácida y la actividad de la ATPasa protónica. Para este estudio se utilizó una cepa de *S. mutans* de colección (ATCC N°:25175) y cepas aisladas de biopelícula dental de superficies lisas y oclusales con y sin caries, obtenidas de niños de la Ciudad de Córdoba. En las membranas de estas diferentes cepas se identificó el perfil de ácidos grasos, a pH 7 y 5, y a partir del mismo se calcularon los parámetros estructurales moleculares, a fin de relacionarlos con los mecanismos de supervivencia del microorganismo en el medio ácido (pH 5). Además, en el *S. mutans* se determinaron los factores de virulencia (sobrevivencia ácida y actividad hidrolítica de ATPasa protónica) a tiempo cero (pH inicial) y a los 30 minutos (pH final). Los resultados mostraron que los perfiles de los ácidos grasos de membrana a pH 5 y 7 son diferentes. Los ácidos grasos de cadena larga e insaturados aumentaron significativamente, a pH 5, en las cepas de la superficie lisa cariada con respecto a las cepas de la superficie oclusal cariada y a la cepa de colección ATCC. Además, los microorganismos aislados de la superficie lisa cariada expresaron mayor

sobrevida ácida y actividad total de la ATPasa protónica con relación a los microorganismos de la superficie oclusal cariada y a la cepa de colección ATCC. Por otro lado, el factor estabilizante de la membrana citoplasmática bacteriana, observado a pH 5, parecería depender de la menor diferencia entre la longitud de la cadena acídica saturada y la longitud de la insaturada. Posiblemente esto indicaría un mayor contacto y/o interacción entre las cadenas hidrófobas de los fosfolípidos de membrana, que favorecería una organización más rígida de la misma. Como consecuencia, la diferente composición de la membrana microbiana podría afectar la interacción entre los lípidos y las proteínas [ATPasa (factor de virulencia)]. En efecto, el mayor contacto hidrófobo del lípido con la proteína, en el caso de la superficie lisa cariada, favorecería la mayor actividad de la ATPasa; por el contrario, el menor contacto hidrófobo lípido/proteína en la superficie oclusal cariada produciría un desajuste entre el componente lipídico y proteico, que podría afectar negativamente la funcionalidad enzimática (ATPasa protónica).

En definitiva, sugerimos que los cambios en el perfil de los ácidos grasos inducidos por el pH 5, en el microorganismo aislado de la superficie lisa cariada, modificaría la organización de la membrana favoreciendo una mejor interacción entre el lípido y la proteína (ATPasa protónica). Como consecuencia de ello la actividad hidrolítica de la ATPasa se incrementaría. Esto significaría una mayor capacidad cariogénica de los microorganismos crecidos en la superficie lisa cariada comparada con los desarrollados en la superficie oclusal cariada.

Palabras Claves: *Streptococcus mutans*, caries, ácidos grasos de membrana, factores de virulencia

ABSTRACT

The *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) are considered as one of the principal agents in the development of dental caries in humans. A feature which contributes to the pathogenicity of this organism is its capacity to metabolize fermentable sugars, and consequently produces various organic acids leading to the pH drop of the surrounding media. Following the pH drop demineralization of the tooth occurs and in turn development of dental caries. These organisms possess virulence factors (acidic survival and activity of the proton ATPase) that enables them to survive in low pH environment and will also provide advantages survival over other bacteria usually present in the oral ecosystem. Studies with strains of *S. mutans* collection (ATCC) indicated that these microorganisms vary the number of double bonds and chain length of the fatty acids of the cytoplasmic membrane in response to the acidic environment. In this thesis we additionally provide new evidences of how different tooth surfaces (different ecological niches) of the same oral cavity, can affect the response to acid environment of indigenous strains of *S. mutans*, bringing the microorganism to change the fatty acid composition of membrane, acid survival and proton ATPase activity. For this study we used a strain of *S. mutans* collection (ATCC No: 25175) and strains isolated from dental biofilm smooth and occlusal surfaces without decay, obtained from children of the City of Córdoba. In the membranes of these different strains identified fatty acid profile, at pH 7 and 5, and from the same structural parameters were calculated molecular weight relate to survival mechanisms of the organism in the acidic environment (pH 5).

The fatty acid profile of the microorganisms grown at pH 5 differed from that at pH 7. At pH 5 an increase of the unsaturated and long chain fatty acids was observed in organisms proceeding from caries of smooth surface (S). These changes were correlated with the determined structural parameters and were related to a membrane organization with increased rigidity. In fact, the average length difference between the saturated and unsaturated acyl chains at pH 5, was smaller than that at pH 7 and indicated a greater contact and / or interaction (stabilizing factor) between chains hydrophobic membrane phospholipids, favoring a greater membrane 'rigidity' or organization thereof. Accordingly the virulence factors, survival acidic and proton ATPase hydrolytic activity were also increased in

organisms proceeding from the smooth surface and grown at pH 5. This stabilizing factor of the bacterial cytoplasmic membrane, observed at pH 5, seems to affect the interaction of lipids and proteins (ATPase, virulence factor). In effect, in the case of the S surface carious where the lipid interaction seems to be higher and probably inducing a better hydrophobic contact with the protein, favored most ATPase activity than in the O surface. On the contrary, the probably diminished hydrophobic lipid / protein contact on the O surface may lead to a mismatch between lipid and protein component, affecting adversely the enzyme functionality (ATPase proton). In short, we suggest that the smooth surface carious (S) specific changes in the organization of the membrane, due to changes of lipid profile, occurring at pH 5 improve the interaction between the lipids and the protonic ATPase, and thus, positively affecting its activity. In turn this would lead to a greater cariogenic capacity of microorganisms grown on the smooth surface carious compared with those developed in the occlusal carious.

Keywords: *Streptococcus mutans*, dental caries, membrane fatty acids, virulence factors

INTRODUCCIÓN

La contribución al mantenimiento de la salud de la población es una de las tareas más importantes a llevar a cabo por los equipos de profesionales relacionados a la salud humana en general. En los últimos años, se ha dado una mayor importancia a la prevención de enfermedades, no solo aquellas causantes de muerte, sino también a las que representan una amenaza para el bienestar de la salud oral, entre estas, la caries dental (Tickle M, 2011).

La caries dental es uno de los trastornos de salud oral que más afecta a los niños; el personal de salud que maneja niños posee, entre otras funciones, la de prevenir las consecuencias físicas y psicosociales que ocasionan la caries dental con una evaluación adecuada de la cavidad oral, educación y la continua recomendación de asistir a la consulta odontológica, para que el niño reciba a tiempo los cuidados que requiere (Subramaniam *et al.*, 2012; Gavazzi *et al.*, 1995).

La etiología multifactorial y la patogenia compleja de la caries dental implican el reconocimiento de aspectos microbiológicos, histológicos, inmunológicos y bioquímicos, que conducen a mejorar el criterio diagnóstico y terapéutico de esta enfermedad. (Reich E, 1999).

Hasta el momento no existen antecedentes sobre estudios que comparen el comportamiento del *S. mutans* cuando es aislado de dos superficies dentales de una misma cavidad bucal. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de Tesis es analizar el comportamiento (algunos factores de virulencia) de cepas autóctonas de *S. mutans*, aisladas de la biopelícula dental de la superficie lisa y oclusal de una misma cavidad oral. A los fines de cumplir con este objetivo se estudiaron las variaciones en la composición de los ácidos grasos de la membrana de *S. mutans* y su relación con la sobrevida ácida y con la actividad de la ATPasa protónica.

Para una mejor comprensión del tema a desarrollar, a continuación, se describen brevemente conceptos básicos de caries dental, mecanismos de producción de la caries, biopelícula dental, *Streptococcus mutans*, pared y membrana bacteriana, ácidos grasos de la membrana bacteriana, sobrevida ácida bacteriana y actividad de la ATPasa protónica bacteriana.

1.1 Caries dental

La caries dental constituye un proceso patológico, infectocontagioso y de etiología compleja. La distribución desigual de esta enfermedad en los países de altos ingresos ha conducido al desarrollo de programas de prevención de salud pública dental dirigidos a individuos considerados como de alto riesgo de contraer caries. La mayoría de los estudios, relacionados a factores de riesgo de caries dental, se han realizado en los países industrializados. Es de destacar que en los últimos años estos estudios también se han realizado en países de mediano y bajo ingreso, expresando que la aplicación de medidas odontológicas preventivas con programaciones perdurables en el tiempo, contribuyen a elevar la conciencia preventiva de la población (Petersen, 2005).

La organización Panamericana de la Salud, afirmó que la caries dental sigue siendo un aspecto fundamental de las condiciones generales de salud en América, por su morbilidad, costo-tratamiento (cirugía, rehabilitación oral), pérdida de elementos dentarios y aplicación de medidas eficaces de prevención (OPS, 1997). Para comprender su fisiopatología es válido considerar a la caries dental como una enfermedad multifactorial, universal y caracterizada por la disolución química, localizada, de los tejidos duros del diente por acción de los ácidos orgánicos, resultante del metabolismo bacteriano de azúcares dietarios de bajo peso molecular (Bordoni *et al.*, 2010).

La combinación de procesos interrelacionados, como la propagación y el metabolismo bacteriano, las propiedades de la saliva y la exposición a hidratos de carbono fermentables, producen cambios en el ecosistema oral, que permite considerar a la caries como una patología compleja (Liljemark y Bloomquist, 1996).

1.2 Mecanismos de producción de la caries dental

En la actualidad se considera a la caries dental como un proceso dinámico y dependiente de las interacciones que ocurren entre los tejidos dentales y los

fluidos bucales que los rodean. El esmalte dental que recubre la corona de los órganos dentarios es un sólido microporoso que transporta diversos elementos químicos desde y hacia el interior del mismo. Su composición es de un 96% de material inorgánico, 1% de material orgánico y 3% de agua. Dicho contenido inorgánico incluye fundamentalmente cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que contienen iones de calcio (36,4%), fosfatos (17,4%), oxidrilos (12,5%) y en menor proporción carbonatos, magnesio, sodio, potasio, fluoruros y cloruros (Driessens *et al.*, 1982). Inicialmente el esmalte posee alto contenido de carbonato y bajo en fluoruro. En presencia de ácido láctico, proveniente de una biopelícula cariogénica, se disuelve una pequeña cantidad de minerales del esmalte, oxidrilos y fosfatos, los cuales difunden hacia el exterior, produciéndose la desmineralización. Este fenómeno no ocurre de manera incesante, ya que por acción del sistema amortiguador de la saliva, el pH se vuelve a estabilizar, logrando incorporarse nuevos cristales en la superficie dentaria; si además en el medio ambiente existen iones de fluoruros, éstos son incorporados en el cristal reparado, dando como resultado el proceso inverso: la remineralización (Hicks *et al.*, 2004).

La lesión cariosa depende del equilibrio entre el proceso destructivo y los procesos defensivos. Cuando aún no se ha producido la cavitación hay invasión bacteriana muy localizada confinada a la dentina superficial. La actividad metabólica progresiva de estas bacterias determina la continuidad del proceso de desmineralización y luego la destrucción de la matriz orgánica (Hicks *et al.*, 2004). La disminución del pH del medio no solo produce un efecto de desmineralización del esmalte sino también induce una respuesta de tolerancia y sobrevida ácida del microorganismo reconocidas como factores cariogénicos del mismo (Lingström *et al.*, 2000).

1.3 Biopelícula Dental

La biopelícula dental es “una masa bacteriana densa constituida por diferentes tipos de microorganismos organizados de forma cocoide, filamentosa o bacilar, embebidos en una matriz intermicrobiana que se acumula sobre las estructuras

del diente” (Simmonds, 2000). La formación de la película adquirida sobre la superficie del elemento dentario es la etapa inicial de la formación de la biopelícula dental. Su desarrollo incluye una sucesión de acontecimientos muy ordenados y perfectamente organizados.

1.3.1 Formación de la película adquirida

La película adquirida está compuesta por una serie de proteínas y glicoproteínas salivales aniónicas que se adsorben a la hidroxiapatita del esmalte. Entre ellas se encuentran la α -amilasa, lisozima, IgA e IgG, mucinas del tipo MG1, histatinas, estaterinas, cistatina, proteínas ricas en prolinas (PRP) y otras. Igualmente se adsorben otros tipos de compuestos de origen bacterianos como glucosiltransferasas, glucanos (especialmente de tipo mutano), ácidos lipoteicoicos (ALT), diversos restos glucídicos y otros. En conjunto, la carga de la película adquirida es electronegativa. La película formada opera como barrera de protección proporcionando lubricación a las superficies y como sitio de unión para la adherencia de los microorganismos (Francia *et al.*, 2007).

1.3.2 Transporte bacteriano a la película adquirida

Luego de formada la película adquirida, con carga electronegativa, es colonizada por microorganismos habituales o residentes de la cavidad oral. Estos microorganismos poseen, como ella, cargas electronegativas, lo que supone una repulsión entre superficies. Para vencerla se establecen enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. También se establecen diversas interacciones iónicas y electrostáticas; tales como: proteína-proteína, lectina-hidrato de carbono mediadas por glucanos, con la participación de glucosiltransferasas y los homopolisacáridos extracelulares bacterianos (*S. mutans*). Las adhesiones que implican iones provenientes de la saliva, como calcio y magnesio, con carga positiva, permiten la unión de componentes bacterianos cargados negativamente a la película adquirida de carga negativa (Scannapieco, 1994). Después de la colonización de la película adquirida por los microorganismos, la biopelícula dental crece por una

multiplicación activa con agregación y coagregación de bacterias. Aumenta de espesor y en las zonas más profundas el potencial de oxidorreducción disminuye, estableciéndose competencia por nutrientes, producción de peróxido de hidrógeno, elaboración de bacteriocinas, consumo de oxígeno y otros (Shu *et al.*, 2000).

1.3.3 Estructura general de la Biopelícula Dental

La biopelícula madura, después de varios días de formación, posee un carácter tridimensional y se considera metabólicamente activa, organizada y potencialmente patógena. Alcanza un punto de saturación a partir del cual ya no es posible aumentar el volumen. Continuamente en su interior hay reorganización y sucesión bacteriana. Este complejo organizado de bacterias sobrevive a los desafíos de un ambiente en constante cambio (Marsh, 2004).

Más de 500 especies bacterianas han sido identificadas en la biopelícula dental, pero son consideradas como cariogénicas solamente unas pocas, entre ellas *Streptococcus* grupo *mutans*, *Lactobacillus* sp y *Actinomyces* sp. Los principales agentes etiológicos de lesiones cariosas en humanos son las especies *Streptococcus mutans* (biotipo I, serotipos *c*, *e*, *f* y *K*) y *Streptococcus sobrinus* (biotipo IV, serotipos *d*, *g* y *h*) [(Masuda *et al.*, 1979) (Fure *et al.*, 1987)]. En resumen, la biopelícula dental no es un conglomerado bacteriano reunido al azar, sino el resultado de la acción recíproca entre la saliva, las bacterias y los mecanismos de defensa del huésped. Es importante entender a la biopelícula dental o placa dentobacteriana como un ecosistema, en donde un complejo de bacterias y sus productos se encuentran embebidos en un material extracelular abiótico de un triple origen: bacteriano, salival y dietario (Sbordone *et al.*, 2003) (Figura 3)

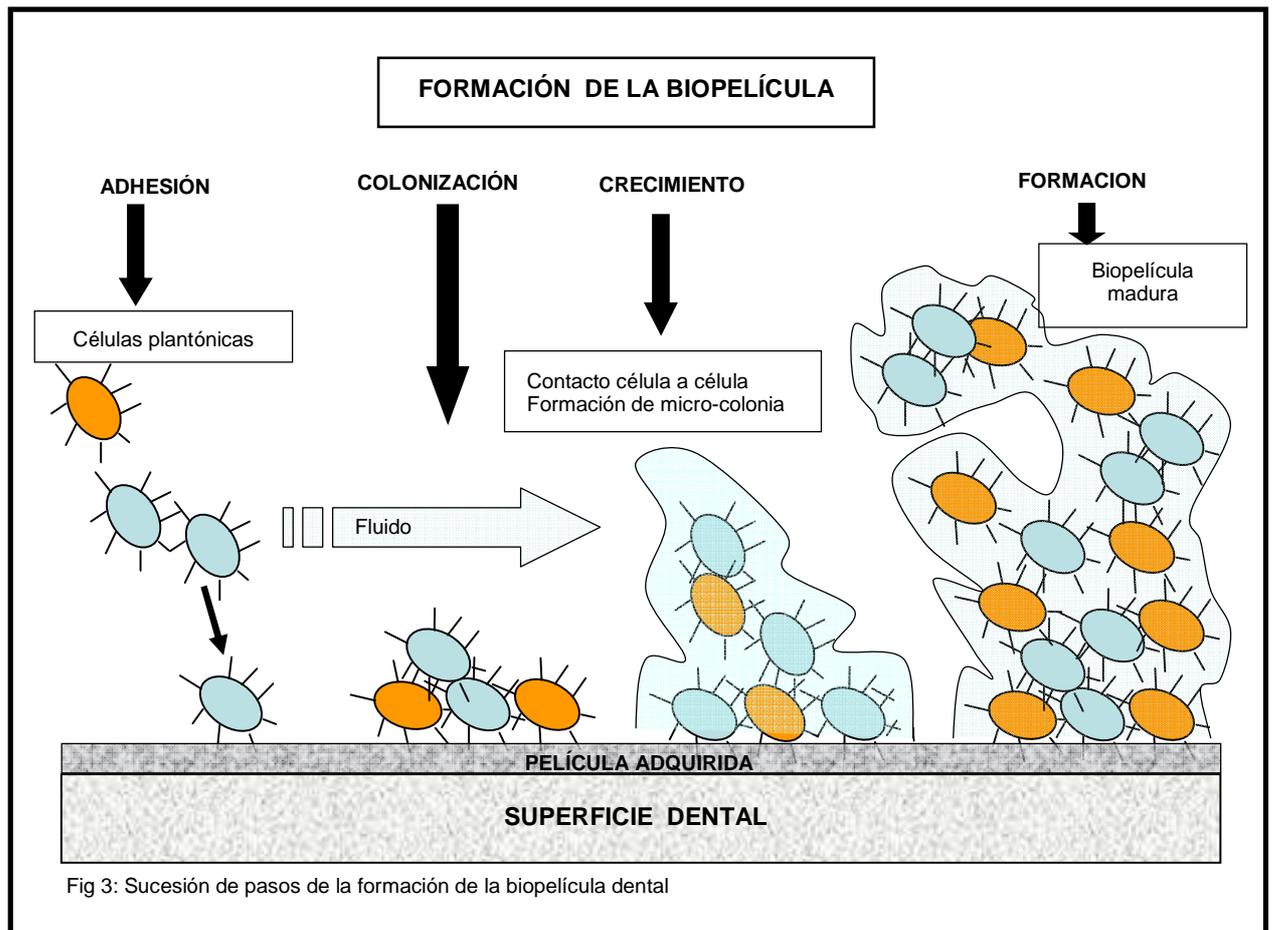


Fig 3: Sucesión de pasos de la formación de la biopelícula dental

1.3.4. Cariogenicidad de la Biopelícula Dental

La biopelícula dental de las superficies orales establece un equilibrio dinámico con las defensas del huesped, compatible con la mantención de la integridad de los tejidos. Las enfermedades orales ocurren cuando la composición y las actividades metabólicas de las comunidades de la biopelícula dental son perturbadas por el pH, tensión de oxígeno, nutrientes del ambiente, entre otros (Burne R A, 1998). Esos cambios ecológicos en la biopelícula dental resultan en un aumento en la proporción de microorganismos patógenos, que poseen determinantes estructurales y enzimáticos más virulentos que los de microorganismos asociados a la salud. La caries es una enfermedad asociada a la biopelícula dental supragingival, esta se ubica desde el margen gingival hacia la

corona dental. La caries es producida por la acción de bacterias acidogénicas y acidúricas, las cuales degradan hidratos de carbono fermentables de la dieta y producen ácidos como resultado de su metabolismo. La cariogenicidad de la biopelícula dental aumenta con la retención de los nutrientes bacterianos y la mayor permanencia de los ácidos orgánicos en la misma. La estructura de la biopelícula dental permite que estos ácidos estén mayor tiempo en contacto con la superficie dental, provocando el proceso de desmineralización (Zaura E y ten Cate J M, 2004).

1.4 *Streptococcus* grupo *mutans*

Los *Streptococcus* grupo *mutans* poseen características comunes de las bacterias gram positivas: anaerobios facultativos que se asocian formando parejas o cadenas de cocos y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. Poseen una capa mucosa compuesta por polisacáridos del tipo glucanos solubles e insolubles en agua. Poseen una familia de enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs) de bajo y alto peso molecular (Liébana et al, 2002). Además poseen una serie de polisacáridos de diferente composición, permitiendo en función de los mismos distinguir los serotipos *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*, y *K* que participan en los fenómenos de adhesión interbacteriana. En los *Streptococcus* grupo *mutans* se incluyen las siguientes especies y sus reservorios: *Streptococcus mutans* (cavidad oral de seres humanos), *Streptococcus sobrinus* (cavidad oral de seres humanos), *Streptococcus cricetus* (cavidad oral de ratas, hamsters y ocasionalmente en humanos), *Streptococcus rattus* (cavidad oral de ratas y ocasionalmente en humanos), *Streptococcus ferus* (cavidad oral de ratas), *Streptococcus downei* (placa dental de monos), *Streptococcus macacae* (placa dental de monos). El serotipo *c* de los *Streptococcus mutans* representa el 70 % de los aislados en la cavidad bucal de humanos, le siguen en frecuencia los serotipos *e*, *f* y *K* (Whiley y Beighton, 1998; Facklam, 2002).

1.5 *Streptococcus mutans*

S. mutans forman parte de la flora microbiana residente en la cavidad bucal y vías respiratorias altas y son patógenos oportunistas en enfermedades humanas tales como caries dental y endocarditis infecciosa (Loesche, 1986; Horaud, T *et al*, 1984) Loesche (Loesche, 1986) demostró la importancia del *S. mutans* en la caries dental. Además, van Houte (van Houte, 1994), señaló que *S. mutans* se encuentra antes y durante el inicio de la lesión de caries. Becker y col. (Becker *et al.*, 2002), a través de técnicas moleculares de identificación bacteriana, señalaron la presencia de *S. mutans* en todas las lesiones de caries profundas examinadas, indicando una fuerte asociación de esta especie con lesiones avanzadas de caries. *S. mutans* poseen importantes propiedades que los capacita a predominar en la biopelícula dental e inducir el desarrollo de las caries.

Estas propiedades se denominan factores de virulencia (Banas, 2004; Welin-Neilands *et al.*, 2007; Khoo *et al*, 2005) y le proporcionan al microorganismo ventajas de supervivencia sobre otras bacterias habituales del ecosistema oral. Entre estos factores de cariogenicidad se destacan:

- a) poder acidógeno, acidófilo y acidúrico
- b) síntesis de polisacáridos intracelulares
- c) síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos hidrosoluble (dextranos), glucanos hidrosolubles (mutanos) y fructanos hidrosolubles (levanos)
- d) efecto post-pH corto
- e) capacidad adhesiva
- f) propiedad agregativa y coagregativa por medio de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos
- g) producción de bacteriocinas con actividad sobre otras bacterias grampositivas.

Banas (Banas, 2004) en su trabajo referido a los factores de virulencia del *S. mutans* concluye que cada una de estas propiedades actúa coordinadamente para alterar la ecología de la biopelícula dental aumentando las proporciones de *S.*

mutans sobre otras especies acidógenas y resistentes al ácido del medio ambiente. Este autor considera de importancia la capacidad del *S. mutans* de utilizar la sacarosa para promover su adhesión y acumulación en la biopelícula dental. Además, indica que estos factores sólo proporcionan al microorganismo un potencial patogénico si la fisiología del huésped y la ecología en general de la microflora oral se lo permiten.

1.6 Pared y membrana bacteriana

S. mutans posee dos estructuras celulares muy importantes que llevan a cabo funciones vitales bien definidas, una es la pared celular, constituida por un polímero denominado peptidoglicano o mureína, junto con ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos cuya función es la de protección frente a la lisis osmótica y la segunda es la membrana citoplasmática, situada por debajo de la pared celular, que transporta nutrientes y/o se excretan sustancias de desecho de la célula. Es la típica membrana plasmática de células eucariotas y procariotas, constituida por una bicapa lipídica que contienen diversas proteínas funcionales y estructurales (Madigan *et al.*, 2004).

1.7 Ácidos grasos de la membrana bacteriana y su relación con la caries dental

La membrana plasmática bacteriana es una barrera selectiva que permite que se concentren en el interior de la célula determinadas moléculas y se excreten las sustancias de desecho. En ella existen proteínas que se clasifican en: a) integrales o intrínsecas, b) periféricas o extrínsecas. Las proteínas integrales están unidas a la bicapa y le confieren estabilidad al conjunto. Desempeñan, entre otras funciones, el de transportar diferentes sustancias (permeasas) y además forman parte de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Las proteínas integrales poseen una región altamente hidrófoba que interacciona con

las zonas apolares de los ácidos grasos, componentes de los fosfolípidos de membrana; además presentan regiones hidrofílicas no membranosas tanto en el exterior como en el interior de la célula. Como ejemplo de éstas últimas podemos mencionar las ATPasas, que desempeñan importantes funciones tanto energéticas como de modulación del pH intracelular y extracelular (Madigan *et al.*, 2004). Las proteínas periféricas están unidas lábilmente a la superficie, tanto interna como externamente, y se encuentran relacionadas a enzimas extracelulares que metabolizan la sacarosa y en consecuencia con la patogenicidad del microorganismo (Madigan *et al.*, 2004).

En la membrana citoplasmática de las bacterias se realizan numerosas funciones bioenergéticas (proteínas integrales relacionadas con el transporte de H⁺ y fenómenos de fosforilación oxidativa), biosintéticas (proteínas integrales relacionadas con la síntesis de diferentes estructuras como pared celular y cápsula) y biodegradativas (proteínas periféricas del tipo exoenzimas que al ser excretadas escinden compuestos complejos convirtiéndolos en más simples y asimilables) (Li y Burne, 2001; Palmer *et al.*, 2012).

El efecto de los lípidos sobre la cariogenicidad ha sido abordado tanto desde el rol que desempeñan como constituyentes de la membrana citoplasmática del microorganismo como desde su efecto sobre la superficie del elemento dentario cuando son añadidos exógenamente.

Szabo y col. (Szabo *et al.*, 1978) analizaron la composición de ácidos grasos en la membrana citoplasmática del *S. mutans*. Observaron el predominio de ácidos grasos saturados (C₁₄ a C₁₈) (49,6%), sobre los ácidos grasos insaturados (C_{14:1} a C_{20:1}) que se encuentran en menor proporción (26,2%). Entre los fosfolípidos más representativos se encuentran fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina.

Los autores Fozo y Quivey (Fozo y Quivey, 2004) demostraron, en una cepa de referencia de *S. mutans* (UA159), que el perfil de los ácidos grasos de membrana dependían del pH extracelular. A pH 7 observaron disminución de los ácidos grasos de cadenas cortas saturadas (13,1%), mientras que a pH 5 los ácidos grasos monoinsaturados se incrementaron (38,5%). Es decir que cuando se

producen cambios en el ambiente, como la disminución del pH, el *S. mutans* modifica su composición en ácidos grasos como una estrategia de sobrevivencia ácida.

Kabara y col. (Kabara *et al.*, 1972) estudiaron el efecto de algunos ácidos grasos (saturados e insaturados) y sus derivados como agentes antimicrobianos sobre microorganismos gram-positivos y gram-negativos. Estos autores demostraron que los ácidos grasos saturados (C_{12}) e insaturados ($C_{18:1}$) añadidos exógenamente fueron inhibidores sobre el desarrollo de los microorganismos gram-positivos, aunque observaron que el ácido graso insaturado ($C_{18:1}$) fue más potente inhibidor que el saturado (C_{12}). Además, indicaron que los derivados aminos (dodecilamino) mostraron actividad antimicrobiana tanto para los organismos gram-positivos como para los gram-negativos.

Hayes (Hayes, 1984) observó el efecto inhibitorio de algunos lípidos añadidos exógenamente sobre el *S. mutans* y la biopelícula dental inducida experimentalmente *in vitro*. Estudiaron los ácidos grasos saturados de 8 a 15 átomos de carbono y sus respectivos monoésteres de glicerol; la máxima inhibición se alcanzó con el ácido graso C_{12} y su monoéster dodecanoil glicerol, ya que forman una capa hidrofóbica sobre la superficie dentaria, inhibiendo la formación de caries. Los autores Kabara (Kabara *et al.*, 1972) y Hayes (Hayes, 1984) no determinaron la composición lipídica del microorganismo, por lo cual omiten toda discusión sobre posibles alteraciones de la membrana plasmática bacteriana. Sin descartar esta posibilidad, las causas de los efectos observados por estos autores, podrían deberse a las alteraciones estéricas de la trama de la biopelícula dental. En efecto, la penetración física, a la trama compleja de la misma, estaría dificultada para moléculas grandes tales como los ácidos grasos de cadenas largas (C_{18} - C_{20}). Por el contrario moléculas más pequeñas como los ácidos grasos de cadena corta (C_{12}) tendrían un mayor poder de penetración logrando formar una capa hidrófoba sobre la superficie dentaria.

Continuando con los efectos sobre la biopelícula dental, el efecto inhibitorio de la insaturación, podría estar relacionado con el grado de flexibilidad de la cadena hidrocarbonada conferida por la cantidad de insaturaciones. Es sabido que el

grado de flexión de la cadena hidrocarbonada afecta el volumen molecular (Kenneth *et al.*, 1991). Estos autores utilizaron un modelo computarizado para investigar cómo la estructura molecular de los ácidos grasos de los fosfolípidos puede afectar las interacciones moleculares de las membranas celulares animales. La doble ligadura del ácido graso C_{18:1} (en C₉-C₁₀) provoca la angulación de la cadena a la vez que reduce la movilidad de la parte terminal de la cadena hidrocarbonada. Kenneth y col. (Kenneth *et al.*, 1991) demostraron que la presencia de dos dobles ligaduras (en C₉₋₁₀ y C₁₂₋₁₃) provoca un movimiento pendular, a nivel del grupo CH₂, hacia ambos lados de la cadena, favoreciendo que el fragmento terminal de la cadena adopte una posición promedio más cercana a la normal de la cadena hidrocarbonada. Esto produce la disminución del volumen promedio de la molécula C_{18:2} con respecto al volumen ocupado por C_{18:1}. Por lo tanto, el menor volumen de C_{18:2} favorece el mayor poder de penetración incrementando su poder inhibitorio en comparación con la del C_{18:1}.

Los autores Tomita y col. (Tomita *et al.*, 2008), quienes trabajaron con microorganismos obtenidos de saliva estimulada de humanos, indicaron que tanto los lípidos como las proteínas que contiene la saliva juegan un importante rol en el desarrollo de la caries del esmalte dental. Contrario a los resultados de Kabara (Kabara *et al.*, 1972) y Hayes (Hayes, 1984), Tomita y col demostraron que las concentraciones de los ácidos esteárico, linoleico y el docosahexaenoico, en saliva, fueron significativamente más elevadas en pacientes susceptible a caries en comparación con pacientes resistentes a la misma.

Las diferencias encontradas por dichos autores podrían fundamentarse en el diferente sustrato utilizado por cada grupo de investigación, ya que en la biopelícula dental la concentración de microorganismos es mayor que en la saliva. Aparte del efecto de los ácidos grasos como barrera física de protección sobre la superficie dentaria, ninguno de estos autores profundizaron sobre los mecanismos moleculares que podrían afectar la capacidad cariogénica del microorganismo.

1.8 Acidez de la biopelícula dental y su relación con la ATPasa

La caries dental está relacionada con la acidez de la biopelícula dental, debido a que los *S. mutans* tienen la habilidad de producir y liberar ácido al medio que lo rodea, mediante la fermentación de diversos azúcares y metabolizando la sacarosa a ácido láctico más rápidamente que otras bacterias (Minah y Loesche, 1977).

Al ser la caries dental una enfermedad crónica, la velocidad de su progresión depende de las condiciones del medio, siendo el incremento de la producción de ácido en el mismo, uno de los factores que más gravitan sobre la velocidad del avance de la lesión cariosa. Existen antecedentes bibliográficos que indican la fuerte relación entre la acidez del medio y la intensidad y progresión de la lesión cariosa (Lingström *et al.*, 2000). La acidez del medio está relacionada con el complejo enzimático ATPasa denominado F-ATPasa y localizado en la membrana plasmática microbiana. La F-ATPasa expulsa protones fuera de la célula, a favor de un gradiente electroquímico, para mantener el pH citosólico más alcalino que el medio externo. El *S. mutans* en su lucha por la sobrevivencia, incrementa la actividad de dicha enzima, disminuyendo el pH del medio (Bender *et al.*, 1986). Los microorganismos aeróbicos, poseen una cadena transportadora de electrones, ubicada en la membrana citoplasmática, donde el aceptor final de los electrones es el O₂ y la función de la F-ATPasa es la de sintetizar ATP.

En condiciones de microaerofilia y/o anaerobiosis, como es el caso de *S. mutans*, el ATP se produce por glicólisis generando ácido láctico y los aceptores de electrones son nitratos, hierro férrico, sulfatos y carbonatos. En estas condiciones, la F-ATPasa hidroliza ATP generando una fuerza protón-motriz que expulsa los H⁺ al exterior celular (Suzuki *et al.*, 2000). Magalhães y col. (Magalhães *et al.*, 2005) determinaron la presencia de otra ATPasa en *S. mutans* denominada P-ATPasa. La misma funciona como un intercambiador de 2 H⁺ por Ca⁺⁺, colaborando de esta manera con la F-ATPasa en la expulsión de H⁺ hacia el medioambiente durante el crecimiento bacteriano.

Los autores Fozo y Quivey (Fozo y Quivey, 2004) observaron que el *S. mutans* resiste la acidificación del medio aumentando la actividad de la enzima F- ATPasa. Cuando los ácidos grasos de membrana del *S. mutans* fueron examinados a dos diferentes pH (7 y 5), observaron a pH 5 un incremento de ácidos grasos de cadenas monoinsaturadas largas, en comparación con la composición observada a pH 7 (38,5% & 23,5%). Además, comprobaron que la actividad de la ATPasa está relacionada a la resistencia ácida del medio y que dicha actividad también estaría afectada por la composición de ácidos grasos de membrana (Fozo y Quivey, 2004). Si bien los autores demuestran una asociación entre los cambios en el perfil de los ácidos grasos de membrana y la actividad de la ATPasa con la resistencia ácida, los hallazgos fueron descriptos utilizando un modelo experimental *in vitro* y una cepa de colección (*S. mutans* UA159).

Las diferentes superficies dentales, lisas y oclusales, podrían sugerir una respuesta diferenciada del microorganismo al medio. Dichas respuestas estarían relacionadas con la composición de los ácidos grasos de membrana y con la actividad de la ATPasa del microorganismo. De acuerdo a esto, se planteó en este Trabajo de Tesis el estudio de la composición en ácidos grasos de membrana del *S. mutans*, que se desarrollan en diferentes superficies dentales (superficies dentales lisas y oclusales) y su relación con la actividad de la ATPasa y la sobrevivencia ácida microbiana. Esto permitiría conocer aquellas condiciones más favorables para el funcionamiento de la ATPasa que resulta en una mayor capacidad cariogénica. Este conocimiento podría facilitar la implementación de estrategias conducentes a revertir dichas condiciones, impidiendo o disminuyendo la actividad de la ATPasa y consecuentemente la actividad cariogénica.

1.9 HIPOTESIS

Las diferentes superficies dentales condicionan algunos de los factores de virulencia cariogénicos (sobrevida ácida, actividad de la ATPasa) de los *Streptococcus mutans*.

1.10 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es estudiar, en una población de niños de la ciudad de Córdoba, el comportamiento de algunos factores de virulencia de cepas autóctonas de *S. mutans*, aislados de biopelícula dental de superficie lisa (L) y superficie oclusal (O) de una misma cavidad oral.

1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y cuantificar la composición en ácidos grasos de membrana de *S. mutans* autóctonos aislados de la biopelícula dental de superficie lisa (L), de superficie oclusal (O) y de una cepa de colección (ATCC, N° 25175).
2. Identificar y analizar parámetros estructurales de membrana de *S. mutans* autóctonos aislados de la biopelícula dental de superficie L y de superficie O.
3. Determinar la sobrevivencia ácida de *S. mutans* autóctonos aislados de la biopelícula dental de superficie L, de superficie O y de una cepa de colección ATCC.
4. Determinar la actividad ATPasa protónica de *S. mutans* autóctonos aislados de la biopelícula dental de superficie L, de superficie O y de una cepa de colección ATCC.
5. Comparar la sobrevivencia ácida y la actividad ATPasa protónica de los *S. mutans* autóctonos aislados de la biopelícula dental de superficie L, de superficie O y de una cepa de colección ATCC.
6. Relacionar la sobrevivencia ácida y la actividad ATPasa protónica de *S. mutans* autóctonos, aislados de la biopelícula dental de superficie L, de

superficie O y de una cepa de colección ATCC, con la composición lipídica de membrana bacteriana.

MATERIALES y MÉTODOS

En este trabajo de Tesis los ensayos experimentales se desarrollaron en el Laboratorio de la Cátedra de Química Biológica “B” de la Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba, en conjunto con el Laboratorio de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

2.1 Cepas Bacterianas

Para los ensayos propuestos se utilizó una cepa de colección de *S. mutans* proporcionada por el American Type Culture Collection, Manassas Virginia, USA (ATCC) Standards Resource® (Designación: N°:25175, NCTC 10449, [IFO 13955] aislamiento: dentina cariada) y veinticuatro cepas de biopelícula dental, de niños con dentición mixta, de las cuales seis fueron de superficies lisas (L) sin lesión de caries y seis con lesión de caries. Las doce cepas restantes de superficies oclusales de fosas y fisuras (O) se dividieron de la misma manera. La biopelícula dental se recolectó de la cara lingual y oclusal de primeros molares inferiores, con no más de seis meses de erupción. Se consideró para la toma de las muestras dos elementos dentarios de una misma cavidad oral, uno con lesión cariosa y el elemento contralateral clínicamente sano como control. El diagnóstico de caries fue realizado por un profesional competente, matriculado y perteneciente al plantel docente de la Facultad de Odontología. UNC. (Dra María Cecilia Martínez) siguiendo el criterio de Pitts (Pitts, 1997), en el marco del proyecto titulado: “Evaluación de la Efectividad de Protocolos de Tratamientos Preventivos en niños con dentición Temporal y Mixta según Criterios de Riesgo Cariogénico”. (Ver Anexo 1). Se tomaron radiografías de aleta de mordida, como método complementario para el diagnóstico de la caries dental, según el criterio de Kidd y col. (Kidd *et al.*, 2003) (Figura 5).



Fig 5: Radiografía de aleta de mordida. La flecha indica caries del esmalte en superficie oclusal

Las cepas bacterianas se colectaron de las siguientes superficies dentarias

- Diente Cariado Superficie Lisa (DCSL)
- Diente Sano Superficie Lisa (DSSL)
- Diente Cariado Superficie Oclusal (DCSO)
- Diente Sano Superficie Oclusal (DSSO)

2.2 Procesamiento de las muestras

El material recolectado de las diferentes superficies dentales se colocó en tubos eppendorf con solución fisiológica estéril (1 ml de solución amortiguadora de fosfato: 0,05 M, pH: 7,3) y se lo remitió inmediatamente al laboratorio a 4°C. Dichos eppendorf se sometieron a agitación vibratoria durante 30 segundos (Precytec. Modelo: 585. Industria Argentina), para el desprendimiento de las bacterias de las paredes del tubo, obteniéndose una suspensión bacteriana madre. Dicha suspensión consta de una mezcla de microorganismos presentes en la película dentobacteriana humana (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, etc). Este material fue procesado para el aislamiento e identificación del *S. mutans*.

2.3 Aislamiento e identificación de los *Streptococcus* grupo *mutans*

De cada tubo eppendorf se tomó 50 µl de suspensión homogénea y se sembró en placas de petri conteniendo agar *Mitis salivarius* Bacitracina (MSB). (DIFCO®,

Becton Dickinson, France) con el agregado de 0,281 mg/ml de bacitracina (ICN Biomedicals, 71 % de actividad) y 20 % de sacarosa (DIFCO®, USA). Este medio es selectivo y de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta como saliva y biopelícula dental. Todas las placas de petri se incubaron en una atmósfera de microaerofilia (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂) a 37°C por 48 h. Se seleccionaron las colonias compatibles con *Streptococcus* grupo *mutans* basándose en su morfología macroscópica, es decir, aquellas de mediano tamaño, tonalidad azul casi negra, prominentes, rugosas o lisa, adheridas al agar. En ocasiones se observó una característica capa mucosa brillante alrededor de ellas. (Pitts, 2001). La adherencia de las colonias al agar fue observada bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000C). Luego se realizó el diagnóstico microscópico (Figura 6) en base a frotis y tinción de Gram de una muestra de colonia aislada.

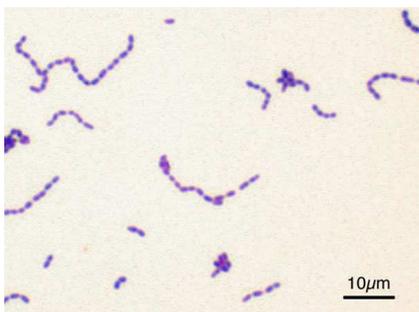
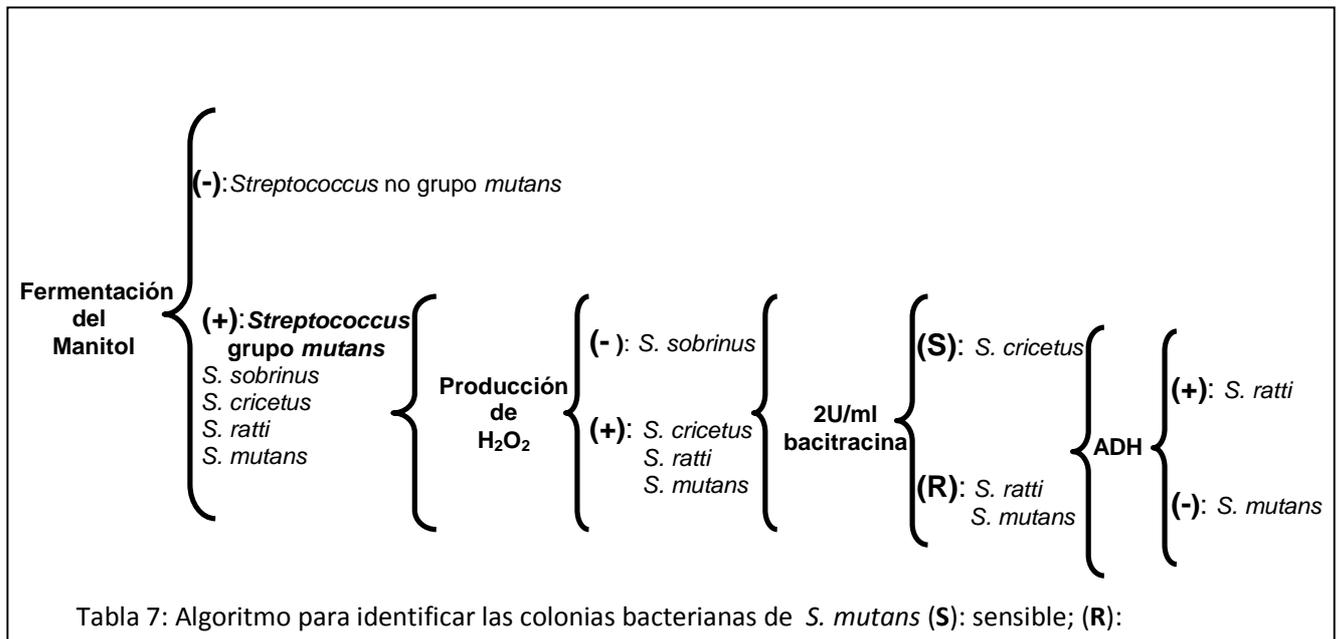


Fig 6: Fotografía de microscopía óptica (Tinción de Gram) de *Streptococcus mutans*.

Las colonias seleccionadas, se inocularon en caldo manitol para diferenciar a los *Streptococcus* grupo *mutans* de los otros grupos de *Streptococcus* como el *Salivarius*, el *Anginosus*, el *Sanguinus* y el *Mitis*.

Para poder diferenciar la especie *S. mutans* de las especies *S. sobrinus*, *S. cricetus* y *S. rattii* se realizaron las pruebas de producción de agua oxigenada, sensibilidad (**S**) o resistencia (**R**) a 2 U/ml de bacitracina (Sigma) y arginina dehidrogenasa-dehidrolasa (ADH), como se muestra en la Tabla 7 (Facklam, 2002; Whiley *et al.*, 1998).



2.3.1 Pruebas utilizadas para la identificación bioquímica de las Cepas

- **Caldo manitol:** Medio líquido preparado con peptona, extracto de levadura y manitol (10 g/l). Como indicador del viraje de color se agrega rojo fenol. **Procedimiento e interpretación:** Las colonias bacterianas se inocularon en este caldo para diferenciar a los *Streptococcus* grupo *mutans*. Los resultados obtenidos fueron: manitol negativo (medio de cultivo de color rojo, los microorganismos no metabolizan el polialcohol) o manitol positivo (medio de cultivo de color amarillo: los microorganismos si metabolizan el polialcohol)
- **Producción de agua oxigenada:** Medio sólido preparado con agar tripteína soja, 5 mg/ml de benzidina (Sigma) y 1 mg/ml de peroxidada (Sigma). **Procedimiento e interpretación:** Después de la inoculación de las colonias bacterianas en este medio, se incubó en atmósfera de microaerofilia a 37°C por 48 h. La prueba se consideró positiva cuando la masa microbiana, sobre el agar sólido, aparece de color marrón y negativa si es incolora.

➤ **Sensibilidad a la bacitracina:** Se inocularon las colonias bacterianas en el caldo manitol, se adicionó 2U/ml de bacitracina (Sigma). Se incubó en atmósfera de microaerofilia a 37°C por 48 h. **Procedimiento e interpretación:** Si el medio de cultivo no presenta cambios de color o no se observa crecimiento bacteriano, la cepa se la considera sensible (S), si ocurre lo contrario es resistente (R).

➤ **Arginina dehidrolasa (ADH):** Medio líquido con 5g de biotina, 5g de extracto de carne de buey, 0,01g de púrpura de bromocresol, 0,005 de rojo cresol, 0,5g de glucosa, 0,005g de piridoxal y 1% de L-arginina dehidrolasa. **Procedimiento e interpretación:** Se inocularon las colonias bacterianas en dos tubos, los cuales contienen el medio de cultivo específico para la determinación de ADH, solamente a uno de ellos (problema) se le adicionó L-arginina, al segundo tubo se lo utilizó como testigo negativo al no contener L-arginina. Se cubrió con una película de parafina líquida estéril. Se incubó en atmósfera de microaerofilia a 37°C por 48 h. La prueba se consideró positiva cuando se observó en el tubo una coloración violeta o rojo violeta (producción de putrecina y NH₃), y como negativa cuando se observó color amarillo.

La hemólisis en placas de agar sangre de carnero es una característica macroscópica de las colonias, que se utiliza como prueba complementaria para la identificación y control de la viabilidad bacteriana.

➤ **Agar sangre de carnero:** Medio sólido preparado con agar base y 5% de sangre de carnero estéril (Gold *et al.*, 1973; Facklam, 2002; Whiley *et al.*, 1998). **Procedimiento e interpretación:** Se inocularon las colonias bacterianas en placas conteniendo agar sangre de carnero. Se incubó en atmósfera de microaerofilia a 37°C por 48 h. Las colonias de *S. mutans* fueron mayoritariamente α y γ hemolíticas, y excepcionalmente β hemolíticas. Esta prueba permite clasificar a las bacterias según el tipo de hemólisis que producen debido a la destrucción de la hemoglobina en medios de cultivo que llevan sangre. Por lo tanto las bacterias son:

α hemolíticas: cuando producen una hemólisis incompleta; se origina un pigmento denominado biliverdina y alrededor de la colonia se forma un halo de color verde.

β hemolíticas: cuando producen hemólisis completa, destruyen completamente la hemoglobina y se origina alrededor de la colonia un halo transparente.

γ hemolíticas: cuando no existe destrucción de la hemoglobina, la colonia no presenta ningún halo, como se muestra en la Figura 8.



Fig 8: Fotografía de cepas de *Streptococcus mutans* sembradas en agar sangre de carnero donde no se observa hemólisis en el medio de cultivo (γ hemolíticas).

2.4 Preparación de las suspensiones bacterianas de trabajo

Una vez aislada e identificada la cepa como *S. mutans* y, a los fines de ampliar cuantitativamente las muestras en estudio, se realizaron suspensiones bacterianas en un medio de cultivo líquido específico para la viabilidad del *S. mutans* [caldo Cerebro Corazón, pH7 (DIFCO)]. Se ajustó la turbidez al equivalente 7 de la escala estándar de McFarland (Amsterdam, 1996), y de esta manera se obtuvo cantidades apropiadas de microorganismos necesarios para los ensayos posteriores. Luego, se realizaron suspensiones de trabajo bacterianas a dos pH diferentes ($\text{pH}7 \pm 0,1$ y $5 \pm 0,1$). A la mitad de las suspensiones bacterianas se las mantuvo a pH 7, mientras que al resto se le adicionó 55,6 mM

de glucosa con el propósito de alcanzar un pH $5 \pm 0,1$. (pHmetro SANXIN Código: PHS-3D-03. Shanghai. San-Xin Instrumentation, Inc. China).

2.5 Determinación de proteínas totales

Se realizaron las determinaciones de las proteínas totales de acuerdo al método de Lowry (Lowry, 1951).

2.6 Extracción de la fracción de membrana del *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

Para la extracción de la fracción de membrana citoplasmática del *S. m* se siguió el método de Magalhães (Magalhães *et al.*, 2003). Un (1) g de células de la suspensión bacteriana de trabajo, de cada una de las superficies dentales, se lavó con 15 ml de agua destilada estéril. El medio acuoso se descartó por centrifugación (10 minutos a 9000 g y a 20 °C) repitiéndose dos veces el lavado.

El precipitado se resuspendió con buffer MES 25mM (ácido 2-N-morfolina etenosulfónico) conteniendo 97mM de NaSCN, pH=6,2. Con este tratamiento se induce la ruptura de la pared bacteriana. Esta suspensión se homogenizó hasta alcanzar una absorbancia de 0,4 a 700 nm (espectrofotómetro: METROLAB UV-VIS. Modelo 325. Industria Argentina). Después de alcanzar esta absorbancia se adicionó 0,4 mg/ml de lisozima (Sigma). Se incubó durante 3 h a 37°C con agitación suave. Posteriormente se centrifugó a 9000 g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose un precipitado conteniendo bacterias desprovistas de su pared. Subsecuentemente y con el propósito de obtener la fracción de membrana, el precipitado se resuspendió y homogenizó con 0,5 ml de buffer MES 50 mM, conteniendo 10mM de SO₄Mg y 0,8 M de ClNa, pH=6,2 (buffer osmótico). Estas muestras se disgregaron utilizando un disruptor de células (Sonicador tip, Vibracell 600V) al 50% de la amplitud, por 20 minutos a 4°C. El disgregado obtenido se incubó por 45 minutos, con agitación suave, a temperatura ambiente, con 25 U

DNAse/ml y 0,25 ml de un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma). Este tratamiento permite eliminar el DNA celular, cuya presencia interfiere con el fraccionamiento de la membrana plasmática. Finalmente, el homogenato total se centrifugó a 100.000 g por 60 minutos a 4°C (Ultracentrifuga Beckman L5-50B) separando una fracción membranosa (precipitado) y el sobrenadante o citosol. El precipitado obtenido, conteniendo la fracción de membrana, se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

2.7 Extracción de ácidos grasos de membrana bacteriana de *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

Las fracciones de membranas se obtuvieron como se indican en la sección 2.7 a partir de 10 ml de la suspensión bacteriana de trabajo.

Los lípidos totales de la fracción de membrana se extrajeron según el método de Folch (Folch, 1957), con cloroformo:metanol (2:1) durante 18 h a 4 °C. Para extraer las impurezas solubles en agua y separar finalmente los lípidos se agregó cloroformo: metanol: agua en una relación 3: 48: 47. Luego, se centrifugó a 4°C por 10 minutos. La fase inferior acuosa, conteniendo las impurezas solubles en agua se desechó. La fase clorofórmica superior del centrifugado, conteniendo los lípidos totales, se llevó a sequedad bajo N₂. Los extractos secos de lípidos totales se incubaron con tolueno (500 µl) y metóxido de sodio (1 ml, 0,5 M) a 4 °C durante toda la noche. (Cantellops *et al.*, 1999). Después de este tratamiento, los metilésteres de ácidos grasos se extrajeron con una cantidad suficiente de hexano. El extracto de hexano se llevó a sequedad con N₂ y se conservó a -80°C hasta su utilización.

2.8 Determinación de los ácidos grasos extraídos de membrana de *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

El perfil de ácidos grasos de membrana de *S. mutans*, crecidos a pH 7 y 5, se identificó usando el cromatógrafo de gases Perkin Elmer (Modelo: Clarus 500, Waltham, USA) equipado con una columna capilar BPX 70, de 30 metros de longitud, con un diámetro interno de 0,25 mm, film de 0,25 μm (Phenomenex, Torrance, USA). La temperatura para el inyector y detector fue de 280°C y la temperatura del horno fue mantenida constante a 190°C.

Los ácidos grasos se identificaron usando estándares comerciales y se expresaron como el porcentaje relativo de la composición total de ácidos grasos. Los solventes orgánicos como cloroformo, metanol, hexano, metóxido de sodio y reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co, St Louis, USA, y los estándares de ácidos grasos fueron provistos por Nu-Check Prep Inc., Elysian, USA.

2.9 Determinación de parámetros estructurales de membrana de *Streptococcus mutans*

Se calcularon algunos parámetros estructurales de membrana bacteriana, a partir de la composición de ácidos grasos de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 7 y 5, a fin de relacionarlos con los mecanismos de sobrevivencia y actividad de la ATPasa bacteriana en medio ácido (pH 5). Con este propósito se calcularon cuatro parámetros estructurales promedio:

- 1) la **longitud** de la **cadena** (LC) de cada uno de los ácidos grasos
- 2) la **contribución proporcional** de la longitud de cada ácido graso, saturado e insaturado, a la **longitud promedio** de la cadena (CPLP)
- 3) la inequivalencia efectiva (ΔC) entre las cadenas acídicas (sn-1 y sn-2)
- 4) el espesor o núcleo hidrofóbico (NH) de la membrana.

Se aplicó el procedimiento de Mason y col. (Mason *et al.*, 1981) el cual asume: 1) que la cadena acídica sn-1 es saturada y la sn-2 es insaturada; 2) que los ácidos grasos se mezclan al azar en los fosfolípidos y 3) que la longitud de la cadena expresada como uniones C-C es igual a $(n_1 - 1)$ y a $(n_2 - 1 - 1,5 - X)$ para cadenas

saturadas e insaturadas, respectivamente. Los parámetros n_1 y n_2 representan el número de átomos de C en las cadenas sn-1 y sn-2, respectivamente; 1,5 representa el acortamiento debido a la flexión de la cadena a nivel del C_2 y X representa el acortamiento de cada doble ligadura (0,5 por el número de dobles ligaduras de cada ácido graso). Una vez determinada la longitud de cada uno de los ácidos grasos (LC) se determinó la contribución proporcional de la longitud de cada ácido graso a la longitud promedio de la cadena (CPLP). De esta manera se determinó la CPLP de las cadenas sn-1 (saturada) y sn-2 (insaturada). La diferencia entre la $CPLP_{saturada} - CPLP_{insaturada}$ es igual a ΔC , que representa el grado de interdigitación o inequivalencia entre las dos cadenas en la bicapa lipídica. De acuerdo a Wang y col. (Wang *et al.*, 1995) el espesor del núcleo hidrofóbico (NH) de la bicapa lipídica es igual a la suma de las CPLP saturadas e insaturadas.

Además, se calcularon la longitud de los segmentos C-C trans que se originan por arriba o por debajo de la doble ligadura. Según Wang (Wang *et al.*, 1995), la longitud de estos segmentos tienen importancia en el grado de interacción de las cadenas, mientras más largo sea el segmento C-C trans (superior o inferior) mayor es el grado de contacto entre las cadenas vecinas. Se aplicó los siguientes algoritmos según Wang (Wang *et al.*, 1995): I) segmento superior = $(n - 5)$, II) segmento inferior = $(Y - n - 2)$, donde n: número del carbono donde se inserta la doble ligadura, luego $(n-1) - 2 - 2 = (n-5)$ es el resultado de restar primero un enlace C-C (los dos primeros carbonos) que son isómeros *gauche* (curvatura de 90°), luego los otros dos enlaces C-C *gauche* que se encuentran inmediatamente antes y después de la doble ligadura, provocando inflexiones de la cadena. Y= número de átomos de carbono de la cadena insaturada (sn-2).

Es de hacer notar, que los enlaces *gauche* se descuentan, pues introducen distorsiones (angulación de 90° con respecto al eje perpendicular de la cadena) en la linealidad de la cadena acídica, por lo tanto, al evaluar el grado de interacción intercadena o grado de estabilidad del núcleo hidrófobo, sólo los fragmentos lineales C-C (trans), que favorecen los mejores contactos cadena-cadena, son considerados.

2.10 Determinación de Fosfolípidos totales de membrana del *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

Los lípidos totales de membrana de *S. mutans*, crecidos a pH 7 y 5, provenientes de las diferentes superficies dentales estudiadas, se cuantificaron utilizando la fase superior clorofórmica de Folch (Folch, 1957) descrita en la sección 2.8. La fase clorofórmica secada bajo corriente de N₂ se mineralizó con el agregado de 100 µl de ácido perclórico (ClO₄H) llevando las muestras a una temperatura de 180°C para completar la mineralización. Con este procedimiento el fósforo unido a moléculas orgánicas es transformado en fosfato inorgánico. Seguidamente se determinó el fósforo inorgánico (Pi) mediante la técnica colorimétrica de Fiske y Subbarow (Fiske y SubbaRow, 1925). Simultáneamente se realizó una curva estándar de fosfato de sodio (PO₄HNa₂) siguiendo el mismo procedimiento descrito, omitiendo la mineralización a 180°C. Los tubos se colocaron a baño maría durante 10 minutos para el desarrollo del color. El fosfato inorgánico reacciona con el ácido molíbdico, se forma un complejo fosfomolíbdico de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fósforo inorgánico presente en la muestra. La reacción se monitoreó a 830nm (espectrofotómetro: METROLAB UV-VIS. Modelo 325. Ind Argentina) (Fiske y SubbaRow, 1925).

A partir de la cuantificación del Pi, se estableció la cantidad de fosfolípidos totales aplicando el Factor de Conversión: $750 / 31 = 24,19$; donde: 750 es el peso molecular promedio de fosfolípidos, 31 es el peso atómico del Pi. Cada valor de Pi se lo multiplicó por dicho factor de conversión. Los valores se expresaron como µg de fosfolípidos totales / 50 µg de proteínas.

2.11 Determinación del pH y sobrevida ácida de *Streptococcus mutans*

Se siguió el criterio de Belli y Marquis (Belli y Marquis, 1991). Se realizó el crecimiento bacteriano en caldo cerebro corazón (DIFCO) en microaerofilia por 18

h a 37°C. Posteriormente, 25 ml de la suspensión se transfirió a 150 ml del mismo caldo. Se incubó por 5 h hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.4 medidos a 720 nm (espectrofotómetro: METROLAB UV-VIS. Modelo 325. Ind Argentina) para obtener una cantidad adecuada de microorganismos. Durante el desarrollo del microorganismo el pH disminuyó. El descenso del pH se midió a dos tiempos diferentes: tiempo cero (pH inicial) y a los 30 minutos (pH final) (pHmetro SANXIN Código: PHS-3D-03. Shanghai. San-Xin Instrumentation, Inc. China). Inmediatamente después de la determinación del pH inicial (ajustado alrededor de $7 \pm 0,1$), se agregó 55,6 mM de glucosa a cada suspensión bacteriana y a los 30 minutos se volvió a medir el pH (pH final).

Para la sobrevida ácida se controló la viabilidad bacteriana a los mismos tiempos de determinación del pH (inicial y final). Se sembró 5 µl de cada suspensión del microorganismo en placas de agar sangre. Seguidamente las placas se incubaron por 48 h a 37°C en microaerofilia. Luego, en cada placa, se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de suspensión bacteriana (UFC/ml).

2.12 Actividad F- ATPasa y P-ATPasa de membrana de *Streptococcus mutans*

La actividad hidrolítica de ATP de las F-ATPasa y P-ATPasa se realizó según la técnica de Magalhães (Magalhães *et al.*, 2005). El sistema reactivo contenía las proteínas (provenientes de la fracción de membrana del *S. mutans* aislada según se indicó en la sección 2.7), suspendidas en buffer BIS-TRIS 50 mM a pH: 6 (bis [2-hidroxietil] imino, tris [hidroximetil] metano), 5 mM de ATP como sustrato; 10 mM de MgCL₂, como cofactor y 4 µg/ml de oligomicina y 3 µM ortovanadato como inhibidores específicos de F-ATPasa y P-ATPasa respectivamente. La reacción se inició con el agregado del ATP y la velocidad inicial de la reacción fue constante hasta los 30 minutos a 37°C, en donde menos del 5% del sustrato fue hidrolizado.

La reacción enzimática se suspendió a los 35 minutos de incubación a 37°C por el agregado de 100 µl de ácido tricloroacético al 10%. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. En este sobrenadante se determinó, según la técnica colorimétrica de Heinonen y Lahti (Heinonen y Lahti, 1981), el fósforo inorgánico liberado. Se agregó molibdato de amonio 10 mM, ácido sulfúrico 5 N, acetona y ácido cítrico 1M para el desarrollo del complejo coloreado, el cual se monitoreó a 355 nm (espectrofotómetro: METROLAB UV-VIS. Modelo 325. Ind Argentina). La actividad de la ATPasa se expresó como µg de fosfato liberado de ATP por 50 µg de proteína.

2.13 Análisis estadísticos

Todos los resultados son promedios de al menos tres experimentos independientes. La descripción de los datos se realizó mediante frecuencias relativas y absolutas. Los datos fueron analizados estadísticamente por prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar porcentajes o valores absolutos de las diferentes variables estudiadas en las diferentes superficies dentales usando el software InfoStat Professional Version 1.1. Se consideró un nivel significativo de p menor a 0,05. Las variables estudiadas fueron:

- Composición de ácidos grasos extraídos de membrana de cepas autóctonas de *S. mutans* crecidos a pH 7 y 5, medidos como % del total de ácidos grasos / 50 µg de proteína
- Fosfolípidos totales de membrana de cepas autóctonas de *S. mutans* crecidos a pH 7 y 5, medidos como ug de PT / 50 ug de proteína
- Sobrevida ácida de *S. mutans*, medidos como UFC x 10³ / ml de suspensión bacteriana
- Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana de *S. mutans*, medidos como ug de Pi / 50 ug de proteína.

RESULTADOS

3.1 Composición de ácidos grasos extraídos de membrana de cepas autóctonas de *Streptococcus mutans*

Los resultados se expresaron como % de la composición total de ácidos grasos / 50 µg de proteína de la suspensión de trabajo [Tabla 9 (pH 7) y Tabla 10 (pH 5)]. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ± el error estándar.

Tabla 9: Perfil Cromatográfico de la composición de Acidos Grasos de membranas de *S. mutans* de diferentes superficies dentarias y ATCC crecidos a pH 7

	ATCC	DSSL	DCSL	DSSO	DCSO
	%	%	%	%	%
Acidos Grasos					
Saturados					
14:0	13,6 ± 0,08	13,7 ± 0,06	13,6 ± 0,08	14,5 ± 0,07	14,1 ± 0,08
16:0	47,3 ± 0,28	47,2 ± 0,23	47,1 ± 0,26	46,2 ± 0,24	46,2 ± 0,25
18:0	6,2 ± 0,04	6,1 ± 0,03	5,8 ± 0,02	6,3 ± 0,03	6,5 ± 0,03
20:0	0,5 ± 0,003	0,5 ± 0,003	0,9 ± 0,004	0,5 ± 0,003	0,7 ± 0,004
Total de ácidos grasos					
Saturados	67,6	67,5	67,4	67,5	67,5
Acidos Grasos					
Insaturados					
14:1	ND	ND	ND	ND	ND
16:1	0,4 ± 0,002	0,4 ± 0,002	0,6 ± 0,003	0,4 ± 0,002	0,5 ± 0,002
18:1	17,4 ± 0,1	17,4 ± 0,1	17,2 ± 0,1	17,4 ± 0,1	17,4 ± 0,1
20:1	5,6 ± 0,03	5,7 ± 0,04	5,7 ± 0,06	5,6 ± 0,03	5,7 ± 0,03
Total de ácidos grasos					
Insaturados	23,4	23,5	23,5	23,4	23,6
Acidos grasos no Identificados	9	9	9,1	9,1	8,9
TOTAL	91	91	90,9	90,9	91,1
IS: Insaturados /					
Saturados	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cadena Larga /					
Cadena Corta	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Estudio del comportamiento de cepas autóctonas de Streptococcus mutans en diferentes localizaciones de la caries dental

ND: no detectados o menos del 5%. Ácidos grasos de cadena larga: C₁₈ y C₂₀. Ácidos grasos de cadena corta: C₁₄ y C₁₆. IS: índice de saturación: Insaturación / Saturación = % de cada ácido graso insaturado x n° de dobles ligaduras / % de ácidos grasos saturados. Cadenas Largas / Cadenas Cortas: es la relación de la suma de porcentajes de ácidos grasos de cadenas largas con respecto a la suma de porcentajes de ácidos grasos de cadenas cortas.

Tabla 10: Perfil Cromatográfico de la composición de Ácidos Grasos de membranas de *S. mutans* de diferentes superficies dentarias y ATCC crecidos a pH 5

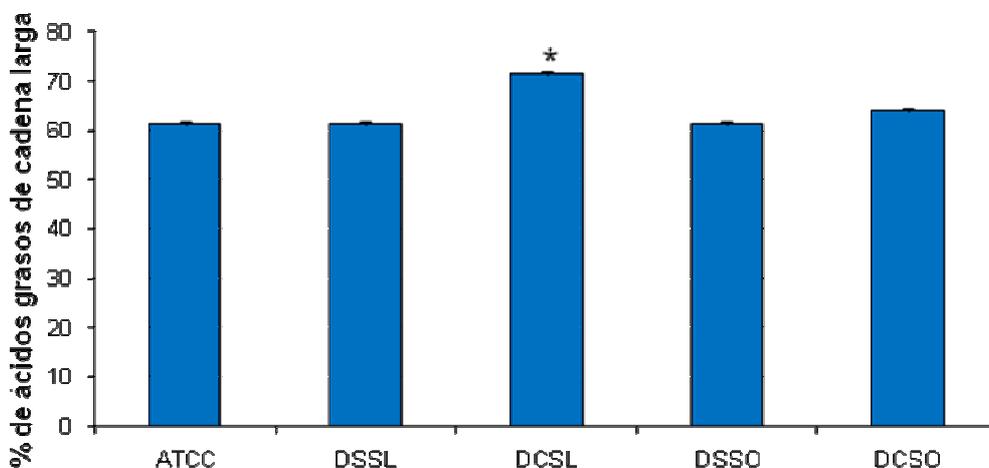
	ATCC	DSSL	DCSL	DSSO	DCSO
	%	%	%	%	%
Ácidos Grasos					
Saturados					
14:00	2,1 ± 0,03	2,01 ± 0,02	2,01 ± 0,04	2,02 ± 0,03	2,01 ± 0,04
16:00	24,1 ± 0,24	25,2 ± 0,25	23,01 ± 0,27	25,2 ± 0,26	24,02 ± 0,27
18:00	12,1 ± 1,08	12,1 ± 1,07	13,01 ± 1,08	12,2 ± 1,06	13,1 ± 1,07
20:00	1,01 ± 0,78	1,01 ± 0,77	2,01 ± 0,79	1,01 ± 0,76	1,01 ± 0,79
Total de ácidos grasos saturados	39,31	40,32	40,04	40,43	40,14
Ácidos Grasos Insaturados					
14:01	ND	ND	ND	ND	ND
16:01	3,02 ± 0,01	3,01 ± 0,02	3,01 ± 0,09	3,01 ± 0,03	3,03 ± 0,01
18:01	27,01 ± 0,15	27,04 ± 0,13	30,01 ± 0,12	27,03 ± 0,13	27,06 ± 0,13
20:01	21,01 ± 0,10	21,03 ± 0,11	26,3 ± 0,09	21,02 ± 0,10	22,7 ± 0,08
Total de ácidos grasos insaturados	51,04	51,08	59,32	51,06	52,79
Ácidos grasos no identificados	9,65	8,6	0,64	8,51	6,07
TOTAL	93,35	93,4	99,51	93,49	96,93
IS: Insaturados/Saturados	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3
Cadena Larga / Cadena Corta	2	2	2	2	2

ND: no detectados o menos del 5%. Ácidos grasos de cadena larga: C₁₈ y C₂₀. Ácidos grasos de cadena corta: C₁₄ y C₁₆. IS: índice de saturación: Insaturación / Saturación = % de cada ácido graso insaturados x n° de dobles ligaduras / % de ácidos grasos saturados. Cadenas Largas / Cadenas Cortas: es la relación de la suma de porcentajes de ácidos grasos de cadenas largas con respecto a la suma de porcentajes de ácidos grasos de cadenas cortas.

Al analizar, los ácidos grasos de membranas de *S. mutans* crecidos a pH 7 (Tabla 9), de las diferentes superficies dentales estudiadas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, es notorio el grado de saturación determinado por el alto contenido de ácidos grasos saturados, que alcanzan a triplicar aproximadamente el contenido de ácidos grasos insaturados (67,4 & 23,5) ($p < 0,002$). También se observa que los ácidos grasos de cadena corta (C₁₄ y C₁₆) son los que aportan el mayor porcentaje de la totalidad de los ácidos grasos saturados. Los valores duplican a los de cadena larga (C₁₈ y C₂₀) ($p < 0,002$).

El análisis porcentual de los ácidos grasos de membranas de *S. mutans* crecidos a pH 5 se muestran en la Tabla 10, en donde se observa que el porcentaje de los ácidos grasos insaturados supera al de los saturados en todas las superficies estudiadas. El análisis de los porcentajes de los ácidos grasos saturados de las muestras bacterianas no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

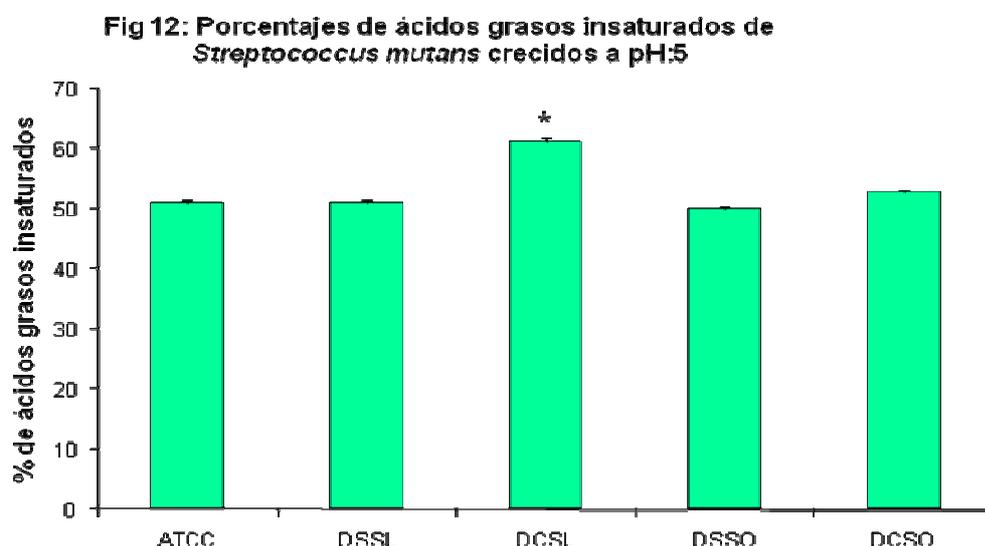
Fig 11: Porcentajes de ácidos grasos de cadenas largas de *Streptococcus mutans* crecidos a pH:5



Incremento del porcentaje de ácidos grasos de cadenas largas en DCSL con relación a ATCC, DSSL, DSSO y DCSO (* $p < 0,05$).

En la Figura 11, se observa un incremento del porcentaje de ácidos grasos de cadenas largas (C_{18-20}) del 16,5 % en DCSL con relación a ATCC, DSSL y DSSO (* $p < 0,05$). Además, el aumento del porcentaje de ácidos grasos de cadena larga en DCSL con relación DCSO fue del 11,6 % (* $p < 0,05$). Contrario a lo observado en microorganismos crecidos a pH 7 (Tabla 9), a pH 5 la relación Insaturados / Saturados incrementa (> 1) a expensas del incremento de los ácidos grasos insaturados en aproximadamente un 30 % en todas las muestras (Tabla 10). Este incremento se debe especialmente al aumento del porcentaje de ácidos grasos insaturados de cadena larga ($C_{18:1}$ y $C_{20:1}$).

Al comparar el grado de insaturación de las diferentes muestras, se observó que sólo en el caso de DCSL la diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 12). El incremento de ácidos grasos insaturados en DCSL con relación a ATCC, DSSL y DSSO fue del 16,1% (* $p < 0,05$), mientras que el porcentaje de ácidos grasos insaturados en DCSL con relación DCSO fue del 12,3 % (* $p < 0,05$) (Figura 12).



Incremento de ácidos grasos insaturados en DCSL con relación a ATCC, DSSL, DSSO y DCSO (* $p < 0,05$)

En conclusión, en DCSL a pH 5, los porcentajes de los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos grasos insaturados se incrementaron con relación a ATCC, DSSL, DSSO y DCSO ($p < 0,05$) (Tabla 13).

Tabla 13: Sumario de la composición porcentual de ácidos grasos de membrana de *Streptococcus mutans* estudiados en las diferentes superficies dentales a pH 5

Superficies	Acidos Grasos de Cadena Larga %	Acidos Grasos Insaturados %
ATCC	61,13 ± 0,36	51,04 ± 0,30
DSSL	61,18 ± 0,35	51,08 ± 0,30
DCSL	71,33 ± 0,42*	59,32 ± 0,35*
DSSO	61,26 ± 0,36	51,06 ± 0,30
DCSO	63,87 ± 0,38	52,79 ± 0,31

Incremento en los ácidos grasos de cadena larga e insaturados en DCSL ($*p < 0,05$) con relación a ATCC, DSSL, DSSO y DCSO.

3.2 Determinación de parámetros estructurales de membrana de *Streptococcus mutans*

Los resultados de LC y CPLP son expresados en la Tabla 14 (A y B a pH 7) y Tabla 15 (A y B a pH 5), en donde se observa que el valor de CPLP, tanto para la cadena saturada sn-1 como para la insaturada sn-2, fue mayor en DCSL que en DCSSO. El incremento de la contribución observada en DCSL se debe al incremento del porcentaje de los ácidos grasos de cadena larga.

Tabla 14 (A) Parámetros estructurales de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 7 y provenientes de **superficie Lisa**

pH 7	DSSL			DCSL		
	Acidos Grasos Saturados	% Saturados		% Saturados		
	Insat	LC	CPLP	Insat	LC	CPLP
14:0	20,29	13	2,64	20,17	13	2,62
16:0	69,92	15	10,49	69,88	15	10,48
18:0	9,03	17	1,54	8,6	17	1,46
20:0	0,74	19	0,14	1,33	19	0,25
Total	99,98		14,70	99,98		14,85
Acidos Grasos Insaturados						
14:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:1	1,7	13	0,22	2,55	13	0,33
18:1	74,04	15	11,11	73,19	15	10,97
20:1	24,25	17	4,12	24,25	17	4,12
Total	99,99		15,40	99,99		15,54

Tabla 14 (B) Parámetros estructurales de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 7 y provenientes de **superficie Oclusal**

pH 7	DSSO			DCSO		
	% Satu-			% Satu-		
Acidos	Insat	LC	CPLP	Insat	LC	CPLP
Grasos						
Saturados						
14:0	21,48	13	2,79	20,88	13	2,71
16:0	68,44	15	10,26	68,44	15	10,266
18:0	9,33	17	1,58	9,62	17	1,63
20:0	0,74	19	0,14	1,03	19	0,19
Total	99,99		14,70	99,97		14,81
Acidos						
Grasos						
Insaturados						
14:1	ND	ND	ND	ND		
16:1	1,7	13	0,22	2,11	13	0,27
18:1	74,35	15	11,15	73,72	15	11,05
20:1	23,93	17	4,06	24,15	17	4,1
Total	99,98		15,40	99,98		15,43

Tabla 15 (A) Parámetros estructurales de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 5 y provenientes de **superficie Lisa**

pH 5	DSSL			DCSL		
	Acidos	% Satu-		Acidos	% Satu-	
Grasos	Insat	LC	CPLP	Insat	LC	CPLP
Saturados						
14:0	4,98	13	0,64	5,01	13	0,65
16:0	62,5	15	9,37	57,46	15	8,61
18:0	30	17	5,1	32,49	17	5,52
20:0	2,5	19	0,47	5,01	19	0,95
Total	99,98		15,59	99,97		15,74
Acidos						
Grasos						
Insaturados						
14:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:1	5,89	13	0,76	5,07	13	0,65
18:1	52,93	15	7,93	50,59	15	7,58
20:1	41,17	17	6,99	44,33	17	7,53
Total	99,99		15,70	99,99		15,78

Tabla 15 (B) Parámetros estructurales de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 5 y provenientes de **superficie Oclusal**

pH 5	DSSO			DCSO		
	% Satu- Saturados	LC	CPLP	% Satu- Saturados	LC	CPLP
Acidos Grasos						
14:0	4,99	13	0,64	5	13	0,65
16:0	62,32	15	9,34	59,84	15	8,98
18:0	30,17	17	5,12	32,63	17	5,55
20:0	2,49	19	0,47	2,51	19	0,48
Total	99,97		15,59	99,98		15,65
Acidos Grasos Insaturados						
14:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:1	5,89	13	0,76	5,73	13	0,74
18:1	52,93	15	7,93	51,25	15	7,69
20:1	41,16	17	6,99	43	17	7,31
Total	99,98		15,70	99,98		15,72

Los valores de ΔC (grado de inequivalencia entre las dos cadenas acídicas saturadas (sn-1) e insaturadas (sn-2) y de NH (espesor del núcleo hidrofóbico) a pH 7 y 5 se muestran en las Tablas 16 y 17, respectivamente.

Tabla 16: Grado de inequivalencia y espesor del núcleo hidrofóbico de los ácidos grasos de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 7

pH 7	DSSL	DCSL	DSSO	DCSO
ΔC	0,65 ± 0,004	0,61 ± 0,004	0,66 ± 0,004	0,63 ± 0,004
NH	30,25 ± 0,18	30,25 ± 0,18	30,23 ± 0,18	30,25 ± 0,18

ΔC: inequivalencia entre las cadenas acídicas sn-1 y sn-2. NH: espesor del núcleo hidrofóbico. Los valores de ΔC y NH en todas las muestras no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 17: Grado de inequivalencia y espesor del núcleo hidrofóbico de los ácidos grasos de membrana de *S. mutans* crecidos a pH 5

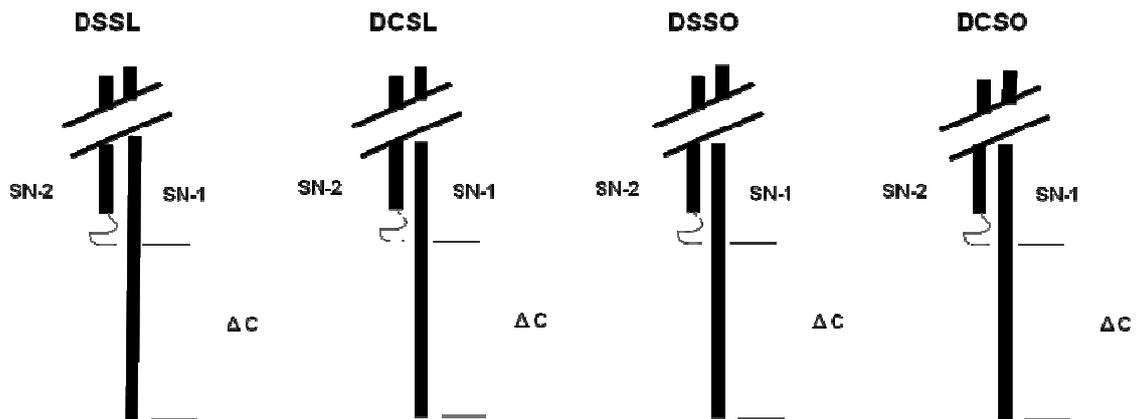
pH 5	DSSL	DCSL	DSSO	DCSO
ΔC	0,11 ± 0,006	0,04 ± 0,002*	0,10 ± 0,006	0,09 ± 0,005
NH	31,30 ± 0,18	31,53 ± 0,19	31,30 ± 0,18	31,39 ± 0,18

ΔC: inequivalencia entre las cadenas acídicas sn-1 y sn-2. NH: espesor del núcleo hidrofóbico. En DCSL se observa una disminución del ΔC con relación a DSSL (*p< 0,05).

Los datos de las Tablas 16 y 17 muestran que al comparar los valores del ΔC a pH 7 y 5, el descenso del pH provocó la disminución del ΔC, indicando que la diferencia entre las longitudes de las cadenas de acilo sn-1 y sn-2 es menor a pH 5 que a pH 7, lo que se traduciría en una mayor interrelación entre las cadenas de acilo vecinas. Además, a pH 5 se observa una disminución del ΔC del 36 % (p< 0,05) en DCSL con relación a DSSL. Por el contrario no se observa diferencia del ΔC entre DCSO y DSSO. Los valores de NH, en todas las muestras, a pH 7 y 5 no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto el espesor del núcleo hidrofóbico no fue afectado por el pH. Finalmente, con el objeto de visualizar estos resultados, se realizó un modelo de diagrama simplificado sobre la

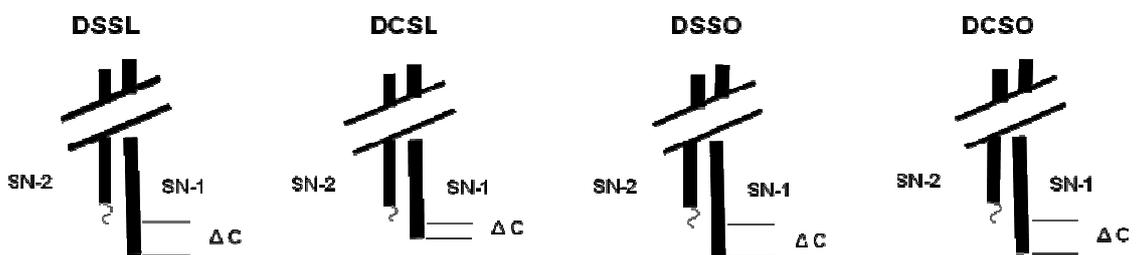
posible conformación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos utilizando el parámetro ΔC . Esto se muestra en las Figura 18 y 19.

Fig 18: Diagrama ilustrativo del parámetro estructural ΔC de membrana de *S. mutans* a pH 7.



Se expresa la posible asociación de los ácidos grasos en fosfolípidos de membrana de *S. mutans* colectados de diferentes superficies dentales. No se observó variaciones significativas en los valores de ΔC de las diferentes superficies dentales. Las líneas onduladas representan el segmento insaturado de los ácidos grasos. Todos los valores son proporcionalmente representados

Fig 19: Diagrama ilustrativo del parámetro estructural ΔC de membrana de *S. mutans* a pH 5.



Se expresa la posible asociación de los ácidos grasos en fosfolípidos de membrana de *S. mutans* colectados de diferentes superficies dentales. Los valores de ΔC fueron diferentes según la superficie dentaria (0,11 para DCSO y 0,04 para DCSL). Las líneas onduladas representan el segmento insaturado de los ácidos grasos. Todos los valores son proporcionalmente representados

En la Tabla 20 se muestra los valores de los segmentos superior e inferior, en relación a la doble ligadura, de los ácidos grasos monoinsaturados incrementados a pH 5 (C_{16:1}, C_{18:1} y C_{20:1}). Los valores no dieron diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 20: Longitud de los segmentos superior e inferior con respecto a la doble ligadura en ácidos grasos monoinsaturados

	Segmento superior	Segmento inferior
C _{16:1}	2	7
C _{18:1}	4	7
C _{20:1}	6	7

Longitud del segmento más largo de tres ácidos grasos monoinsaturados: C_{16:1}, C_{18:1} y C_{20:1}

3.3 Fosfolípidos totales de membrana de *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

El análisis de los fosfolípidos totales (PT) de membrana de *S. mutans*, crecidos a pH 7, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes superficies. Por el contrario, a pH 5 se observó un mayor incremento de fosfolípidos en DCSL con relación a DSSL (18,3 %, *p= 0,003). Los fosfolípidos en DCSO incrementaron en un 7,5% con relación a DSSO (*p=0,03). El incremento de fosfolípidos en DCSL con relación DCSO fue del 10 % (*p<0,05). DCSL mostró un incremento del 24 % (p= 0,003) con respecto a la cepa control ATCC, mientras que el incremento en DCSO fue sólo del 12 % (p=0,004) con relación al mismo control. Las superficies sin lesión cariosa no mostraron diferencias estadísticamente significativas con relación a la cepa ATCC. No se observó diferencias significativas entre las superficies sanas y ATCC (Tabla 21).

Tabla 21: Fosfolípidos totales de membrana de *S. m* provenientes de las diferentes superficies dentales y ATCC crecidos a pH 7 y 5

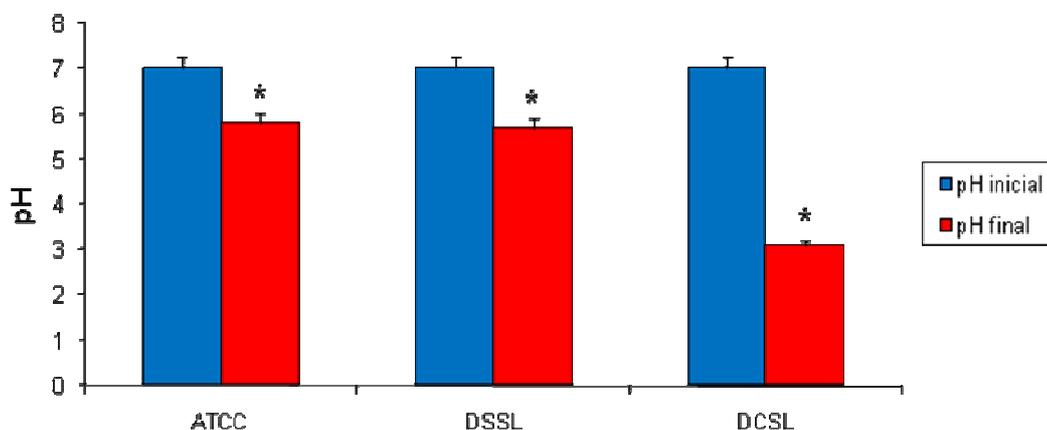
Superficies	ug de PT / 50 ug de prot pH7	ug de PT / 50 ug de prot pH5
ATCC	5,25 ± 0,03	6,20 ± 0,04
DSSL	5,49 ± 0,02	6,49 ± 0,03
DSSO	5,49 ± 0,04	6,49 ± 0,04
DCSO	5,58 ± 0,03	6,98 ± 0,05
DCSL	5,58 ± 0,02	*7,68 ± 0,05

Mayor incremento de fosfolípidos en DCSL con relación a ATCC, DSSL, DSSO Y DCSO a pH 5 (*p= 0,003). Los valores a pH 7 no muestran diferencias estadísticamente significativas.

3.4 pH en suspensiones bacterianas de *Streptococcus mutans*

El pH fue determinado en alícuotas de suspensiones bacterianas provenientes de las diferentes superficies. Se midió a dos tiempos diferentes, a partir de tiempo cero (pH inicial) y a los 30 minutos (pH final). A tiempo cero, las alícuotas contenían igual número de colonias viables; habiéndose determinado la viabilidad de las mismas en placas de agar sangre de carnero (sección 2.12).

Fig22: Variación del pH en estadio sano y cariado de superficie lisa y ATCC

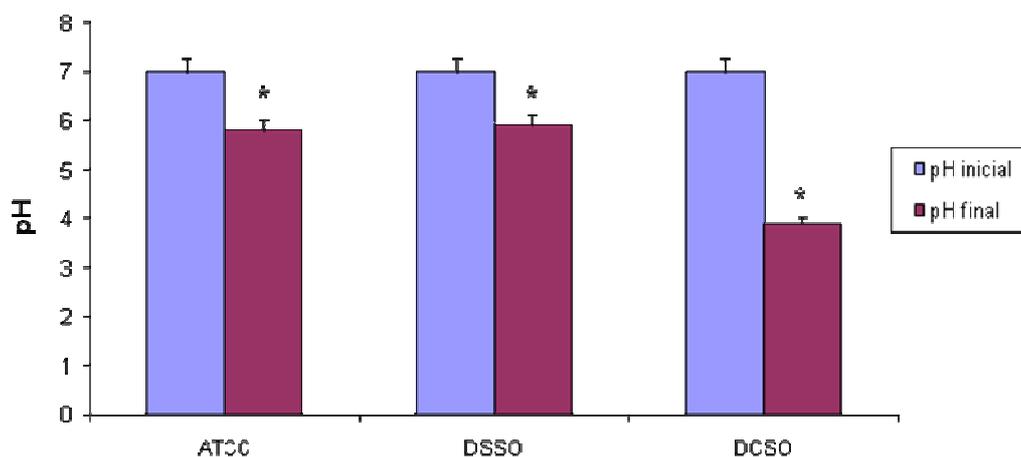


pH inicial: tiempo 0, pH final: 30 minutos. Descenso del pH en ATCC, DSSL y DCSL con relación al valor inicial. (* $p < 0,002$)

El análisis de las variaciones del pH de las suspensiones de microorganismos provenientes de ATCC, DSSL y DCSL se muestra en la Figura 22. El máximo descenso de pH se observó a los 30 minutos con relación al valor inicial en DCSL (56 %, $p < 0,002$). Por el contrario el descenso de ATCC y DSSL con relación al tiempo cero fue de 17 %, $p = 0,05$, en ambos casos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DSSL y el ATCC.

Al realizar el mismo análisis en superficie oclusal, el máximo descenso fue observado en DCSO (44%, $p < 0,002$) en relación al pH inicial. Mientras que los descensos observados en ATCC y DSSO fueron del 17% ($p = 0,05$) y 16% ($p = 0,05$), respectivamente. Entre ATCC y DSSO no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,02$). Estos resultados se muestran en la Figura 23.

Fig 23: Variación del pH en estadio sano y cariado de superficie oclusal y ATCC



pH inicial: tiempo 0, el pH final: 30 minutos. Descenso de pH en DCSO con relación al valor inicial (* $p < 0,002$). Descenso de pH en ATCC, y DSSO con relación al tiempo cero (* $p = 0,05$).

Comparando los descensos de pH (inicial & final) de las suspensiones de microorganismos de ambas superficies cariadas (56 % en DCSL y 44 % en DCSO) se observa el mayor descenso en *S. mutans* provenientes de la superficie lisa ($p < 0,05$). Estos resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Variación porcentual del pH entre superficies cariadas

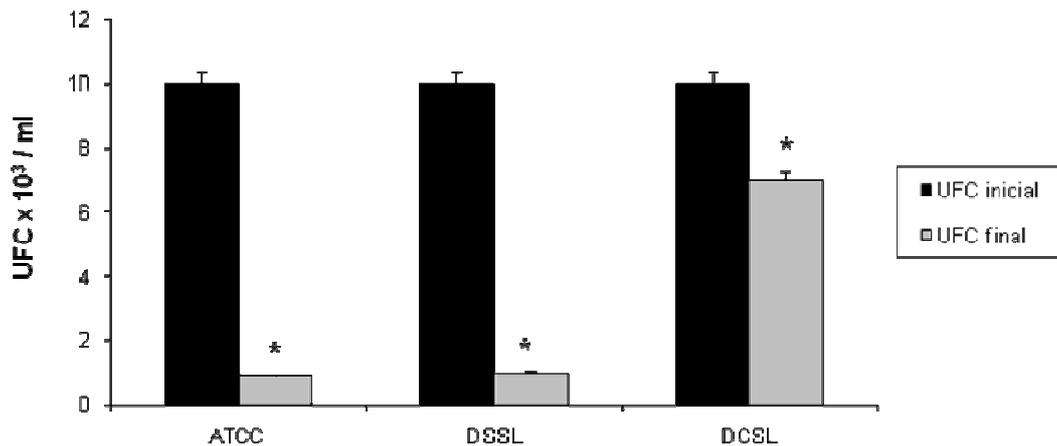
	pH inicial	pH final	Descenso %
DCSL	$7 \pm 0,04$	$3,1 \pm 0,02$	$56 \pm 0,3^*$
DCSO	$7 \pm 0,04$	$3,9 \pm 0,02$	$44 \pm 0,2$

Descenso de pH final con relación a pH inicial. Menor % del descenso del pH en DCSL con relación a DCSO (* $p < 0,05$).

3.5 Sobrevida ácida de *Streptococcus mutans*

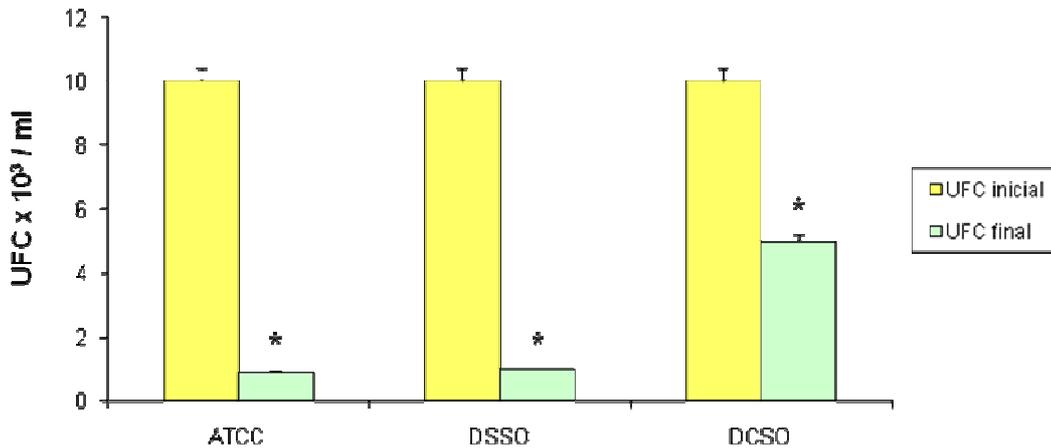
La sobrevida ácida es una medida de la viabilidad bacteriana o resistencia ácida, y se expresa como la diferencia de las UFC/ml de una suspensión bacteriana, entre tiempo 0 (pH inicial) y 30 minutos (pH final). Todas las suspensiones de microorganismos indicadas contenían inicialmente (tiempo 0) igual número de colonias viables. Las variaciones de las UFC/ml de las suspensiones bacterianas de superficie lisa (SL) y ATCC a los 30 minutos se muestran en la Figura 25, observando mayor resistencia a los cambios de pH de microorganismos provenientes de DCSL ($7 \cdot 10^3$ UFC/ml) comparado con la resistencia de los microorganismos provenientes de DSSL ($1 \cdot 10^3$ UFC/ml) y ATCC ($9,1 \cdot 10^2$ UFC/ml). El descenso de UFC/ml en DCSL fue del 30% (* $p < 0,002$); en DSSL 90% (* $p < 0,001$); y en ATCC 91% (* $p < 0,001$). No se observó diferencias significativas entre DSSL y ATCC (* $p = 0,02$).

Fig 25: Variación de las UFC/ml en estadio sano y cariado de superficies lisa



UFC/ml inicial a tiempo 0 (pH inicial); UFC/ml final: UFC/ml a los 30 minutos (pH final). Aumento de la sobrevida en DCSL en relación a ATCC Y DSSL (* $p < 0,001$)

Fig 26: Variación de las UFC / ml en estadio sano y cariado de superficie oclusal y ATCC



UFC/ml inicial a tiempo 0 (pH inicial); UFC/ml final: UFC/ml a los 30 minutos (pH final). Aumento de la sobrevida en DCSO en relación a ATCC Y DSSO (*p < 0,001)

Las variaciones de las UFC/ml de suspensiones bacterianas provenientes de superficie oclusal (SO) con y sin lesión cariosa, comparadas con ATCC, se muestra en la Figura 26, observando la mayor resistencia ácida en microorganismos provenientes de DCSO ($5 \cdot 10^3$ UFC/ml), comparada a la resistencia de microorganismos provenientes de DSSO ($1 \cdot 10^3$ UFC/ml) y ATCC ($9,1 \cdot 10^2$ UFC/ml). El descenso de UFC/ml en DCSO fue del 50% (*p < 0,002); en DSSO 90 % (*p < 0,001) y en ATCC 91% (*p < 0,001). No se observó diferencias significativas entre DSSO y ATCC (*p = 0,02).

En la Tabla 27 se muestra la sobrevida ácida (UFC/ml / 30 minutos) de microorganismos provenientes de superficies cariadas (DCSL y DCSO). Se evidencia la mayor sobrevida de microorganismos provenientes de DCSL con respecto a los de DCSO (70 % y 50% respectivamente) (*p < 0,05).

Tabla 27: Variación porcentual de la Sobrevida ácida (UFC/ml) entre superficies cariadas

	UFC inicial	UFC final	Sobrevida Ácida %
DCSL	$1.10^4 \pm 60$	$7.10^3 \pm 42$	$*70 \pm 0,4$
DCSO	$1.10^4 \pm 60$	$5.10^3 \pm 30$	$50 \pm 0,3$

Mayor sobrevida de microorganismos en DCSL con relación a DCSO (* $p < 0,05$).

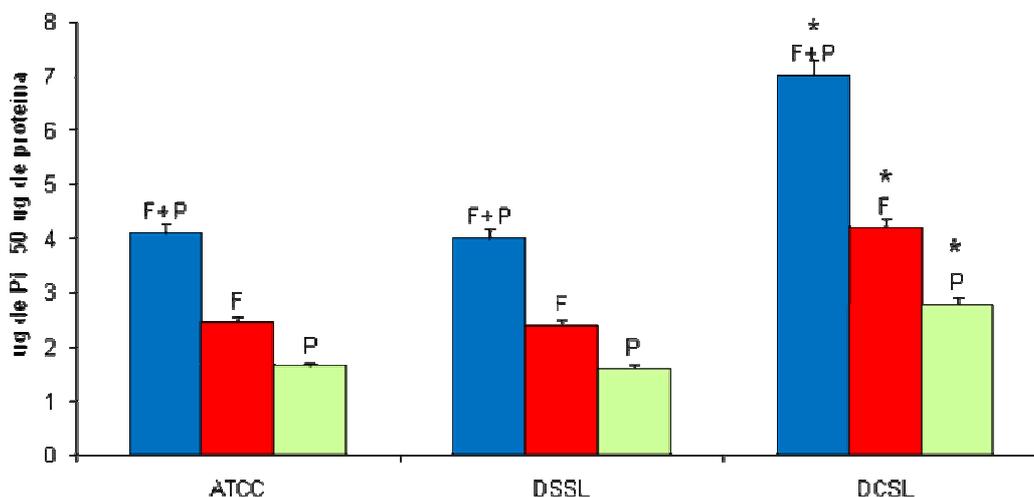
3.6 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana de *Streptococcus mutans*

3.6.1 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana en microorganismos provenientes de superficie lisa

En la Figura 28 se muestra la actividad total de la ATPasa comparativamente con las actividades de las F- y P-ATPasas de microorganismos provenientes de ATCC y superficie lisa.

Los microorganismos provenientes de DCSL mostraron un incremento de la ATPasa total de un 75 % ($p = 0,002$) con respecto a la misma superficie pero carente de lesión (DSSL). Este incremento fue a expensas del incremento de ambas ATPasas, F- y P-ATPasa, que fueron de un 45 % y 30 %, respectivamente, en comparación con los valores observados en ATCC y DSSL. Al comparar los valores de las actividades enzimáticas, de microorganismos de DSSL con los de ATCC, no se observó diferencia significativa ($p = 0,3$). Estos datos se muestran en la Figura 28.

Fig28: Actividad de ATPasa en superficie lisa y ATCC

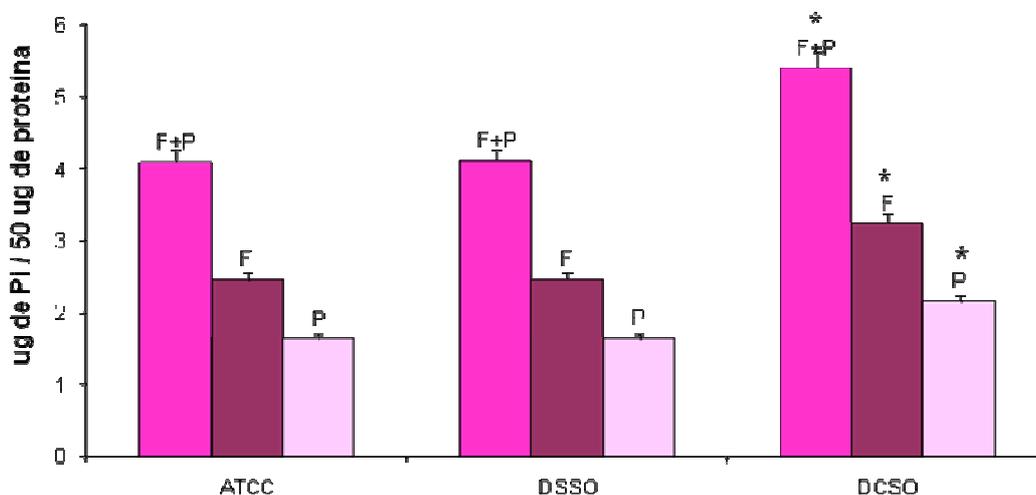


P+F: Pi liberado en ausencia de inhibidores (actividad total), **F:** Pi liberado en presencia de ortovanadato (inhibidor de la P-ATPasa); corresponde a la actividad de la F-ATPasa, **P:** Pi liberado en presencia del oligomicina (inhibidor de la F-ATPasa); corresponde a la actividad de la P-ATPasa. Mayor actividad en DCSL en relación a ATCC y DSSL.

3.6.2 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana en microorganismos provenientes de superficie oclusal

Las actividades enzimáticas de la superficie oclusal mostraron un comportamiento similar al observado en la SL. En DCSO se incrementa las actividades de ambas enzimas con respecto a ATCC (F-ATPasa 18,6 %, $p= 0,002$) y (P-ATPasa 12,4 %, $p= 0,002$) (Fig 29). No obstante, el incremento de la actividad total (31 %) como el incremento de cada una de las actividades de las ATPasas, en relación a ATCC, fueron menores que los observados en microorganismos provenientes de la superficie lisa. Al comparar los valores de las actividades enzimáticas, de microorganismos de DSSO con los de ATCC, no se observó diferencia significativa ($p= 0,3$). Estos datos se muestran en la Figura 29.

Fig 29: Actividad de ATPasa en superficie oclusal y ATCC



P+F: Pi liberado en ausencia de inhibidores (actividad total), **F:** Pi liberado en presencia de ortovanadato (inhibidor de la P-ATPasa); corresponde a la actividad de la F-ATPasa, **P:** Pi liberado en presencia del oligomicina (inhibidor de la F-ATPasa); corresponde a la actividad de la P-ATPasa. Mayor actividad en DCSO en relación a ATCC y DSSO.

Comparando las actividades hidrolíticas de las enzimas ATPasa total, F- y P-ATPasas de membrana de *S. mutans*, se evidencia una mayor actividad hidrolítica en DCSL con relación a DCSO (75% & 31%) ($p < 0,05$). Datos que se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Actividades hidrolíticas de las enzimas ATPasa total, F- y P-ATPasas en superficies cariadas

Superficies	Actividad de ATPasa Total %	Actividad de F-ATPasa %	Actividad de P-ATPasa %
DCSO	31 ± 0,18	18,6 ± 0,11	12,4 ± 0,07
DCSL	*75 ± 0,45	45 ± 0,27	30 ± 0,18

Los valores indican el incremento porcentual de ATPasa total, F-ATPasa y P-ATPasa en DCSL en relación a DCSO (*p< 0,05).

3.7 Resumen de los diferentes parámetros analizados de *Streptococcus mutans* provenientes de superficies cariadas

A los fines de facilitar la comprensión de los cambios inducidos por el pH, detallamos en la siguiente Tabla 31, la relación de los valores de los parámetros analizados a pH 7 y 5, con diferencias estadísticamente significativas. Los incrementos fueron comparativamente mayores en DCSL.

Tabla 31: Relación de los diferentes parámetros analizados de *Streptococcus mutans*

DETERMINACIONES	ATCC	DCSL	DCSO
Acidos Grasos Cadena Larga pH7 / pH5	0,48	0,41	0,47
Acidos Grasos Insaturados pH7 / pH5	0,45	0,40	0,50
Fosfolípidos Totales pH7 / pH5	0,84	0,72	0,79
pH inicial / pH final	1,20	2,25	1,79
Sobrevida Acida UFC inicial /UFC final	10,9	1,42	2
ATPasa total inicial / final	4,1	0,58	0,76

En **DCSL** se observa I: incremento de los valores de ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos insaturados y fosfolípidos totales a pH 5 con relación a pH 7, II: mayor disminución del pH, mayor sobrevida ácida y un incremento de la actividad de la ATPasa total final con relación a DCSO y ATCC.

DISCUSIÓN

La cubierta externa del *S. mutans* consta, principalmente de la pared celular y la membrana citoplasmática. La pared celular está formada por un polímero denominado peptidoglicano, ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos cuya función es la de protección frente a la lisis osmótica. La membrana citoplasmática, similar a toda membrana biológica, rodea el citoplasma de la célula procariota. Consta de una doble capa de lípidos que se estabiliza por interacciones hidrófobas entre residuos de ácidos grasos de los lípidos y por interacciones electrostáticas entre sus cabezas hidrófilas. En esta doble capa de lípidos se insertan proteínas denominadas proteínas integrales o transmembrana. Otras proteínas están ancladas en la superficie exoplásmica o ectoplásmica de la membrana y se las denomina periféricas (Madigan *et al.*, 2004).

Las membranas plasmáticas bacterianas presentan una proporción más alta de proteínas (60%) que las membranas plasmáticas de las células eucariotas (30%), probablemente debido a las numerosas funciones que realizan, dada la carencia de organelas intracelulares. En células eucariotas, dichas funciones, se llevan a cabo en membranas de organelas internas (Madigan *et al.*, 2004). Los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular del *S. mutans* son derivados de fosfogliceridos, siendo los de mayor proporción fosfatidilglicerol (65%), cardiolipina (difosfatidilglicerol) (18%) y fosfatidilcolina (12%) (Szabo *et al.*, 1978).

Lembo y col. (Lembo *et al.*, 2007), determinaron una distribución genotípica de *S. mutans* aislados de niños con y sin caries activas. Estos autores expresaron que las poblaciones de los microorganismos se diferencian según los factores del medio externo tal como la disponibilidad de sacarosa, que facilita su colonización.

Lambert y col. (Lambert y Moss, 1976) describieron una fuerte relación taxonómica de *S. mutans* con *S. salivarius* utilizando el análisis de la composición de ácidos grasos de membrana celular de dichos microorganismos.

4.1 Composición de ácidos grasos extraídos de membrana de cepas autóctonas de *Streptococcus mutans*

El análisis de la composición de los ácidos grasos de membrana de diferentes microorganismos se utiliza, en conjunción con otros métodos como el estudio del genoma, para la identificación de especie y subespecie microbiana. El estudio de la composición lipídica de diferentes poblaciones bacterianas posee aplicaciones para confirmar y establecer relaciones filogenéticas microbianas, que se logra no sólo sobre la base de la semejanza de los ácidos grasos en cuestión, sino por el análisis de su variabilidad (Lembo *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las localizaciones más frecuentes de la lesión de caries como las superficies oclusales y las superficies lisas del esmalte con las posibles diferencias de sus respectivos microambientes, pareció importante como objetivo de esta Tesis, el estudio del comportamiento de cepas autóctonas de *S. mutans*, aisladas de biopelícula dental de dichas superficies, con y sin lesión de caries en comparación con una cepa de referencia ATCC. Es de hacer notar, que el estudio de algunos factores de virulencia (ácido tolerancia, acidogénesis, producción de polisacáridos intracelulares, etc) del *S. mutans* en microambientes como saliva y biopelícula dental han sido reportados por los autores como Welin-Neilands (Welin-Neilands *et al.*, 2007) y Khoo (Khoo *et al.*, 2005). Sin embargo, no hay antecedentes bibliográficos de estudios sobre el comportamiento del *S. mutans* en las superficies lisas y oclusales de elementos dentarios de una misma cavidad oral, las cuales se abordan en este trabajo de Tesis.

En nuestro estudio, el perfil de los ácidos grasos de las distintas muestras estudiadas (Tabla 9 y 10) revelan la presencia del ácido graso C_{20:1} (6 a 20%) y el bajo porcentaje del ácido graso C_{20:0} en todas las superficies analizadas (0,5 a 2%). Nuestros resultados concuerdan con los datos reportados por Lambert (Lambert y Moss, 1976) quienes expresaron que la presencia de un mayor porcentaje del ácido graso C_{20:1} con respecto a C_{20:0}, distingue a *S. mutans* y *S. salivarius* de todas las otras especies orales.

Quivey y col. (Quivey *et al.*, 2000) demostraron que *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* crecidos en medios ácidos inducen cambios en la composición de ácidos grasos de sus membranas. Dichos autores reportaron que las células microbianas (*S. mutans* UA159 y *S. sobrinus* 6715) crecidas en cultivos

a pH 5 mostraron un mayor porcentaje (2,82 veces) de ácidos grasos insaturados (C_{18:1} y C_{20:1}) (47,7%) en comparación con los porcentajes observados a pH 7 (16,9%). Además, expresaron una disminución (1,43 veces) de los porcentajes de los ácidos grasos saturados (C_{14:0} y C_{16:0}) a pH 5 (39%) en comparación con los porcentajes observados a pH 7 (55,7%).

Similarmente, en nuestro estudio al comparar el perfil de los diferentes ácidos grasos de membrana, en cepas de *S. mutans* crecidas a pH 7 y pH 5 (Tabla 9 y 10), se observó un incremento (2,16 veces) de ácidos grasos insaturados a pH 5 (54,3%) en comparación con los porcentajes observados a pH 7 (25%). Por el contrario los valores de los ácidos grasos saturados en todas las superficies estudiadas a pH 5 (40%) reveló una disminución (1,7 veces) con relación a los porcentajes a pH 7 (68%).

Además, la relación incremento / disminución de los ácidos grasos de membrana citados, en las cepas de referencias estudiadas por Quivey (Quivey *et al.*, 2000) fue de 1,97 (2,82 / 1,43), mientras que en nuestras cepas, la misma relación fue de 1,27 (2,16 / 1,7). Esto podría estar indicando características particulares de la cepa autóctona de *S. mutans*.

En nuestra investigación concluimos que el perfil de los ácidos grasos de membrana de *S. mutans* se diferenció a pH 5, con respecto al perfil de los microorganismos desarrollados a pH 7, en todas las muestras. A pH 5, DCSL reveló diferencias significativas en ácidos grasos de cadena larga e insaturados con relación a DCSO. Esto indicaría que en DCSL, el mecanismo de sobrevivencia del *S. mutans* al ambiente ácido estaría acompañado con cambios en el perfil de sus ácidos grasos de membrana. Este tipo de cambios podría afectar la organización de la bicapalipídica y en consecuencia la correlación entre los segmentos hidrófobos del lípido y la proteína (ATPasa), cuya función es la de mantener la permeabilidad protónica de la membrana.

4.2 Parámetros estructurales de membrana de *Streptococcus mutans*

Continuando con nuestra investigación y en base a los cambios observados en la composición de ácidos grasos de membrana de *S. mutans* a pH ácido, se analizaron algunos parámetros estructurales de membrana, a fin de establecer las consecuencias y/o posibles bases moleculares epigenéticas relacionadas a los mecanismos de sobrevivencia del microorganismo en ambientes ácidos.

En nuestro estudio, al mismo pH, la longitud promedio de la cadena acídica saturada (CPLP_{saturado}) y de la cadena insaturada (CPLP_{insaturado}) fueron similares en ambas superficies [Tabla 14 (A)(B) y 15(A)(B)]. Por esta razón y considerando que el NH es la suma de las longitudes de ambas cadenas saturadas e insaturadas, no se observaron diferencias significativas del NH entre ambas superficies a un mismo pH. Esto está indicado en las Tablas 16 y 17, donde los valores del núcleo hidrófobo (NH) de las dos superficies cariadas (DCSL y DCSO) no variaron significativamente a un mismo pH. Como el espesor del núcleo hidrófobo puede afectar la interacción lípido-proteína (Wang *et al.*, 1995), debido a la falta de correlación entre los segmentos hidrófobos del lípido y el de la proteína, podemos inferir que el espesor del NH, no es un factor determinante para la inducción de alteraciones en las interacciones lípido-proteína en ninguna de las dos superficies a un mismo pH. Por otro lado, es necesario remarcar que el NH no es el único factor que puede alterar la relación lípido-proteína. En efecto, el grado de interacción en el plano horizontal y vertical de la membrana puede afectar el funcionamiento de los componentes proteicos de la membrana. A pH 5, en DCSL el menor valor de ΔC observado, indicaría una mayor interrelación entre las cadenas acídicas sn-1 y sn-2 vecinas en el plano horizontal. Al realizar el mismo análisis en el plano vertical, el menor valor de ΔC , indicaría una menor interdigitación entre las cadenas de acilos de las dos monocapas lipídicas. (Figuras 18 y 19). Al comparar los valores del ΔC , se observaron diferencias inducidas por el pH. En efecto, en ambas superficies, el descenso del pH, provocó la disminución del ΔC (Tablas 16 y 17). Esto indica que a pH 5, la diferencia entre las longitudes de las cadenas de acilo sn-1 y sn-2 es menor que a pH 7. Por lo tanto, la interrelación en el plano de la membrana entre las cadenas de acilo vecinas sería mayor, lo que llevaría a un incremento de la estabilidad de la bicapa

lipídica comparada con la estabilidad a pH 7. Además, a pH 5 se observa una disminución del ΔC del 56 % ($p < 0,05$) en DCSL con relación a DCSO (Tabla 17); esto indicaría que *S. mutans* en DCSL, a pH5, modifica más intensamente la organización de su membrana con un mayor incremento de la estabilidad o interacción cadena-cadena con respecto a DCSO. Los autores Calderón y Eynard (Calderón y Eynard, 2000) estudiaron la relación entre diferentes ácidos grasos ($C_{22:6n-3}$ y $C_{18:2n-9}$) y las propiedades anisotrópicas de la membrana plasmática de urotelio de rata, concluyendo que el papel modulador de los ácidos grasos sobre la rigidez de la membrana plásmática posiblemente estaría mediado por la composición de los ácidos grasos, las longitudes de cadenas acídicas saturadas e insaturadas y por la libertad de movimiento de las cadenas acilo de los fosfolípidos constituyentes la membrana.

En nuestro estudio, al comparar los ácidos grasos monoinsaturados $C_{16:1}$, $C_{18:1}$ y $C_{20:1}$ en DCSL (Tabla 9 y 10), se observó a pH 5 un incremento de 5, 1,8 y 4,6 veces respectivamente, en comparación con los valores a pH 7. La posición de la doble ligadura en cada uno de estos ácidos grasos varía, siendo la misma, posicionada en el C_7 , C_9 y C_{11} , respectivamente. Esto abre la posibilidad de que la organización de la membrana, a distintos niveles de profundidad de la misma, sea diferente. (Calderón y Eynard, 2000). En nuestro trabajo, a pH 5, la longitud de los segmentos superior e inferior con respecto a la doble ligadura en ácidos grasos monoinsaturados ($C_{16:1}$, $C_{18:1}$ y $C_{20:1}$) no mostraron diferencias significativas (Tabla 20). Por lo tanto si el segmento C-C *trans* más largo no varía, este factor no afectaría, en las condiciones estudiadas, el grado de contacto entre las cadenas. Sin embargo, a pH 5 el porcentaje de ácidos grasos insaturados en DCSL es mayor que en DCSO, por lo tanto es posible sugerir que en DCSL a pH 5, se produciría un incremento de áreas de mayor contacto, originando, en definitiva, una superficie de membrana más rígida.

Por lo tanto, la posición de la doble ligadura no afectaría ni el NH ni la interacción en los segmentos terminales (profundidad de la bicapa) de las cadenas acídicas. La mayor estabilidad o interacción sugerida en DCSL, en relación a DCSO a pH 5,

estaría dada solamente, por la disminución del ΔC y la mayor proporción de ácidos grasos insaturados.

Es importante considerar que los lípidos de las membranas pueden encontrarse, en función de la temperatura, en dos estados o fases diferentes. Fase de *gel* donde las cadenas hidrocarbonadas del lípido están en estado más rígido que en la fase de *crystal-líquido* o fluida. La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de *gel* a *crystal-líquido* se denomina *temperatura de transición* (T_m) (Wang *et al.*, 1995).

Estudios calorimétricos han indicado que los valores de T_m de los lípidos de la bicapa dependen fundamentalmente de la suma total de átomos de carbono de ambas cadenas de acilo (sn-1: saturado y sn-2: insaturado) así como la posición del doble enlace a lo largo de la cadena de acilo sn-2 (Wang *et al.*, 1995). En efecto, T_m depende de las propiedades de los lípidos que constituyen la bicapa. La presencia de fosfolípidos con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas provoca una disminución de T_m , debido a que los dobles enlaces producen torsiones en las cadenas y por consiguiente irregularidades en el empaquetamiento de las cadenas acídicas que conducen y facilitan el incremento de la movilidad de las mismas y la disminución de la temperatura a la cual se produce la transición de fase. Por otra parte, la presencia de fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas saturadas en la bicapa, incrementan el T_m debido a que estos fosfolípidos presentan una elevada capacidad de agregación / interacción y baja movilidad (Wang *et al.*, 1995).

En nuestro trabajo, a pH 7 y 5, en DCSL, los porcentajes de los ácidos grasos insaturados fueron del 23,5 y 59,32 % respectivamente (Tabla 9 y 10). No obstante, se dijo anteriormente que el T_m depende del número total de átomos de carbono. Según los estudios calorimétricos de Wang y col (Wang *et al.*, 1995), el incremento de 18 a 20 átomos de carbono en la posición sn-2 induce el incremento de T_m de 5,6 a 13,2. Si consideramos que en nuestro estudio el cambio de pH de 7 a 5, en DCSL, incrementa los ácidos grasos de cadena larga (18 y 20 átomos de carbono), es razonable hipotetizar un probable incremento de T_m a pH ácido, lo que se relacionaría con una disminución de la movilidad de las

moléculas lipídicas (mayor interacción acilo-acilo) cuando el pH desciende de 7 a 5. Si bien, no hemos efectuado estudios calorimétricos, esta hipótesis parece tener soporte en el dato experimental de nuestro estudio, que muestra la disminución del ΔC a pH 5. Esto significa que la diferencia entre las longitudes de las cadenas saturadas e insaturadas disminuye, favoreciendo el mayor contacto cadena-cadena.

Nuestros datos, indicarían una mayor estabilidad de la bicapa lipídica en DCSL a pH 5 que a pH 7. Esta estabilidad no dependería específicamente del grosor del núcleo hidrofóbico, ni de la longitud del segmento lineal C-C trans más largo de la cadena acídica sn-2 (insaturada). El posible factor estabilizante que ocurriría a pH 5 parecería depender del incremento de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (posición sn-2) que aumentaría las áreas de contacto, justificando la disminución del ΔC (longitud de sn-1: saturado – longitud de sn-2: insaturado) e incrementando la estabilidad de la bicapa.

4.3 Fosfolípidos totales de membrana de *Streptococcus mutans* crecidos a pH 7 y 5

En la tabla 21 los datos indican que la cantidad de fosfolípidos de membrana provenientes de todas las superficies estudiadas aumentaron con el descenso del pH. La muestra ATCC, a pH 5 y 7, se diferencia de las muestras DSSL y DSSO por su menor cantidad de fosfolípidos. Esto podría indicar otra diferencia de las cepas autóctonas con respecto a cepas de colección.

A pH 5 se observó incremento de fosfolípidos en DCSL en relación a DCSO. Una de las interpretaciones posibles es que el mayor incremento de fosfolípidos en DCSL en relación al incremento en DCSO, a pH 5, indicaría un aumento de la densidad de las cadenas acídicas. Si esto es así, la movilidad de las cadenas dentro de la bicapa estaría disminuída a pH ácidos. Esto se correlaciona con los otros hallazgos (disminución del ΔC e incremento de la longitud de la cadena sn-

2), todos indicativos de un aumento de contacto entre las cadenas acídicas y el probable incremento de la estabilidad de la membrana.

Nuestros datos permiten sugerir que la membrana plasmática de los microorganismos desarrollados hasta alcanzar un pH de 5 en DCSL posee mayor rigidez u organización que los desarrollados en idénticas condiciones en DCSO. Esta conclusión se basa en la disminución del ΔC , determinada por el aumento de la longitud de las cadenas acídicas en la posición sn-2 (insaturada), que aumenta las áreas de membrana de mayor inmovilidad. Acorde a estos resultados se observó el incremento de fosfolípidos en DCSL con respecto a DCSO, lo que incrementaría la densidad de las cadenas acídicas y consecuentemente su inmovilidad. Es necesario remarcar que los efectos de las interacciones electrostáticas de las cabezas polares de los fosfolípidos no han sido abordados en este trabajo y que los resultados encontrados representan solo una parte de un sistema complejo de interacciones electrostáticas e hidrófobas, positivas y negativas.

4.4 Sobrevida ácida y pH en suspensiones bacterianas de *Streptococcus mutans*

Muchas bacterias de la biopelícula dentobacteriana contribuyen de manera significativa a la formación de caries, ya que son capaces de producir suficiente ácido (pH 5) como para iniciar una lesión de caries. Los organismos implicados en la enfermedad de la caries, como *S. mutans*, deben ser capaces no sólo de crecer, sino que deben poseer la capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos.

Los autores de Soet y col. (de Soet *et al.*, 2000) analizaron en un rango de pH entre 7,0 a 5,0, la velocidad media de producción ácida de *S. mutans* y *S. sobrinus* en comparación con otros estreptococos orales (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. vestibularis*) concluyendo que la velocidad con la que *S. mutans* produce ácido es significativamente mayor que la de los otros estreptococos orales.

En nuestros hallazgos al comparar pH inicial y pH final entre DCSL y DCSO encontramos que la muestra que acidificó más el medio fue DCSL (pH final: 3,1) (Tabla 24). La diferencia en la capacidad de acidificación del medio de los microorganismos provenientes de las distintas superficies estudiadas muestra el diferente comportamiento o expresión fenotípica de las cepas desarrolladas en la superficie DCSL. Esto estaría indicando la mayor capacidad cariogénica de la cepa, probablemente inducida por el diferente ecosistema desarrollado en la superficie lisa cariada, poniendo de manifiesto la particular importancia del mismo. El poder acidógeno (factor de virulencia) de *S. mutans* puede conducir a cambios ecológicos en la flora de la biopelícula dental, que incluye un aumento de la proporción de *S. mutans* productores de ácido al medio y la disminución de la flora sensible a dicha acidez (*Streptococcus mitis*, *oralis* y *sanguis*) (Banas, 2004). Acompañando al poder acidógeno, *S. mutans* posee la característica de la tolerancia ácida. Conserva su capacidad de sobrevida incluso a niveles de pH que son inhibitorios para algunas especies bacterianas (pH 4.4), siendo esto una característica distintiva de *S. mutans* (Matsui y Cvitkovitch, 2010). En nuestro trabajo, encontramos que la sobrevida ácida, medida como UFC/ml, fue mayor en DCSL comparada con DCSO (Tabla 27), coincidiendo con el desarrollo de una membrana posiblemente más rígida y más resistente al medio externo adverso (mayor acidez) y en consecuencia con una cepa con mayor poder acidógeno.

En definitiva, en DCSL los microorganismos fueron más acidógenos y simultáneamente tuvieron una mayor resistencia y sobrevida a la acidez del medio. Esto nos permite definir a los microorganismos desarrollados en DCSL como los de mayor capacidad cariogénica comparados con los desarrollados en DCSO.

Nuestros resultados indican que una de las posibles estrategias para el incremento de la sobrevida ácida de *S. mutans* en DCSL consistiría en cambiar el propio perfil de ácidos grasos de su membrana desde cadenas saturadas y cortas (pH 7) a cadenas monoinsaturadas y largas (pH 5). En las secciones anteriores se analizaron estos cambios y se definieron como inductores de un incremento en la interrelación de las cadenas acídicas en la bicapa lipídica, que permite

correlacionarlo con el posible incremento de la estabilidad de la misma (mayor rigidez).

4.5 Actividad de la F-ATPasa y P-ATPasa de membrana de *Streptococcus mutans*

Se conoce que F-ATPasa y P-ATPasa están presentes en la membrana de *S. mutans* para mantener la homeostasis intracelular. Estas enzimas constitutivas representan ATPasas con funciones de bombas de protones (Bender *et al.*, 1986). La inducción de las bombas de protones en ambientes ácidos y la consiguiente expulsión de protones de la célula al exterior ayuda a mantener un elevado pH citoplasmático en relación a su entorno (Kuhnert *et al.*, 2004). La actividad de estas enzimas es de suma importancia para la tolerancia ácida de microorganismos tales como *S. mutans*, de tal manera que el pH óptimo de la F-ATPasas está directamente relacionado a la capacidad del microorganismo para sobrevivir en condiciones ácidas (pH 5) (Bender *et al.*, 1986). Además de las F-ATPasas, Magalhaes y col. (Magalhaes *et al.*, 2003) demostraron otros mecanismos enzimáticos que pueden ayudar a mantener un pH citosólico cercano a la neutralidad durante el crecimiento del microorganismo. Magalhaes y col. identificaron una proteína de membrana 100-kDa que puede mantener un pH intracelular por encima del medio externo. Este grupo postuló que esta proteína, diferente a la F-ATPasa, debido a su sensibilidad a ortovanadato y lansoprazol funciona como una P-ATPasa.

Los protones provenientes de la vía glucolítica anaeróbica, acidifican el citoplasma, pero las enzimas glucolíticas como otras funciones celulares son sensibles a la inhibición por la acidez intracelular. Por lo tanto, la función de la F- y P-ATPasa es la de translocar protones al exterior y mantener un gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática compatible con la vida (Thedei *et al.*, 2008). La actividad de la F- y de la P-ATPasa es un reflejo de la capacidad de sobrevivida del microorganismo. Bender y col. (Bender *et al.*, 1986) determinaron la actividad

de ATPasa total en cepas de referencia (ATCC) de diferentes microorganismos (*S. sanguis* NCTC 10904, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. faecalis* ATCC 9790, *S. mutans* GS-5, y *Lactobacillus casei* ATCC 4646). Estos autores encontraron incrementada la actividad de la F-ATPasa de membrana de microorganismos desarrollados en medio ácido, indicando que la actividad enzimática es uno de los mecanismos principales de la tolerancia ácida para estreptococos orales.

Considerando que el funcionamiento de las ATPasas es dependiente de la organización y/o composición de la membrana y basado en nuestros resultados que evidenciaron diferencias en la sobrevivencia ácida y diferencias estructurales de membrana dependientes de la superficie (DCSL y DCSO) propusimos estudiar la actividad de las ATPasas en ambas superficies. De esta manera intentamos ampliar los conocimientos referentes a los posibles mecanismos involucrados en la tolerancia ácida desarrollada en un ambiente de heterogeneidad ecológica, como la cavidad oral. A nuestro entender los efectos de las diferentes superficies de una misma cavidad oral, sobre las bombas de protones (ATPasa), no han sido abordados hasta el momento.

Por otro lado, según Marcelle y col. (Marcelle *et al.*, 2004) *S. sobrinus* 6715 posee una mayor resistencia ácida que *S. mutans* UA159; estos autores expresaron que las diferencias en los mecanismos de tolerancia ácida entre los dos microorganismos se debe a que *S. sobrinus* es constitutivamente o genéticamente ácido tolerante.

De esta manera Marcelle y col. (Marcelle *et al.*, 2004) estudiaron los mecanismos moleculares génicos que regulan la adaptación de *S. sobrinus* a un ambiente ácido. Sin embargo, estos autores no consideraron factores epigenéticos como la organización de la membrana que alberga las proteínas translocadoras de protones, ni la viabilidad que puede desarrollarse en una misma cavidad oral. Por esta razón, consideramos que los resultados de esta Tesis, constituyen un antecedente con respecto al estudio de estos factores epigenéticos.

Como se mencionó anteriormente, en la membrana plasmática existen proteínas integrales o transmembrana (F-ATPasa y P-ATPasa); las interacciones entre este

tipo de proteínas de membrana y el ambiente lipídico que las rodean son importantes para determinar la estructura y función de la misma.

Según los estudios de Marsh Derek (Marsh Derek, 1995) las proteínas integrales de la bicapa lipídica requieren que la sección transmembrana hidrófoba de la proteína coincida con la región hidrófoba de los lípidos, a fin de evitar un contacto energéticamente desfavorable en dichas regiones. En dicho trabajo, se expresó que cuando no hay coincidencias en las zonas hidrófobas lípido-proteína, se producen desajustes que llevan a una separación de fase o segregación de los componentes lipídicos con los proteicos, creando dominios enriquecidos en uno de los dos componentes. Además, concluyeron que la longitud de las cadenas acídicas de los lípidos de la bicapa afectan el estado de agregación de la proteína o desajuste hidrófobo lípido-proteína. Marsh Derek (Marsh Derek, 1995), en su trabajo, concluyó que cuando la longitud de la cadena acídica (C_{18}) es mayor que la extensión hidrófoba de la proteína, esta tiende a agregarse formando dímeros, separándose del lípido y disminuyendo la interacción hidrófoba entre ambos; por el contrario cuando la longitud de la cadena es menor (C_{12}) que la zona hidrófoba de la proteína, se producen agregados monoméricos de la proteína con lípidos atrapados dentro de los mismos, estableciendo interacciones con la proteína. Con longitudes de cadenas intermedias (C_{14}), se producen coincidencias con las zonas hidrófobas de la proteína y esta adopta una forma monomérica, quedando la totalidad de su superficie hidrófoba en total coincidencia con la de los lípidos. Estos resultados indican que el desajuste o no coincidencia en la zona hidrófoba puede conducir a la separación del lípido en relación a los componentes proteicos, y formar dominios con predominio de lípidos o proteínas.

Nuestros resultados indican que el ΔC (diferencia entre las longitudes de sn-1 y sn-2) es menor en DCSL en comparación a la de DCSO (Tabla 17). Esto nos indica que las superficies hidrófobas en ambos casos serían diferentes, siendo mayor en el caso de DCSL. Este resultado junto con la mayor actividad de ATPasa (Tabla 30) encontrada en DCSL y homologando los mismos con las conclusiones de Marsh Derek (Marsh Derek, 1995), podemos hipotetizar que el mayor contacto hidrófobo del lípido con la proteína, en el caso de DCSL, favorecería la mayor

actividad de la ATPasa. Por el contrario, el menor contacto hidrófobo lípido/proteína en DCSO produciría un desajuste entre el componente lipídico y proteico, que podría afectar negativamente la funcionalidad enzimática (ATPasa total).

Coincidiendo con Marsh Derek (Marsh Derek, 1995), Lee (Lee, 2004), expresa en su trabajo, la necesidad de una correlación entre las regiones hidrófobas de la proteína con la de los lípidos que la rodean, para la óptima funcionalidad de la misma. Lee (Lee, 2004) enuncia que el espesor hidrófobo de la bicapa debe coincidir con el espesor hidrófobo de la proteína embebida en la bicapa, a causa de los altos costos energéticos que se producen cuando las cadenas de acilo de los ácidos grasos o los aminoácidos hidrófobos contactan con agua. Sin embargo Lee (Lee, 2004), a diferencia de Marsh Derek (Marsh Derek, 1995), hace foco sobre aspectos geométricos o topológicos de la membrana y puntualiza que la falta de coincidencia entre los espesores hidrófobos de la bicapa del lípido y la proteína conduce a la distorsión de la bicapa lipídica, o de la proteína, o de ambos, para minimizar el desajuste. Lee (Lee, 2004) asume, en su trabajo, que las cadenas de acilo vecinas a una proteína de membrana ajustan su longitud para que coincida con el espesor hidrófobo de la proteína. En efecto, cuando el espesor hidrófobo de la bicapa es menor que el de la proteína, las cadenas lipídicas vecinas a la proteína se “estiran” para proporcionar una bicapa más gruesa, creando una curvatura positiva (exocitosis). A la inversa, cuando el espesor hidrófobo de la bicapa es mayor que el de la proteína, las cadenas lipídicas se “comprimen” para proporcionar una bicapa más delgada, creando una curvatura negativa (endocitosis). Los cambios relativamente pequeños en la unión de lípidos con las proteínas son debido a los cambios de las longitudes de las cadenas de acilo. Los resultados de Lee (Lee, 2004), sugieren que las cadenas de acilos se “estiran” o “comprimen” para proporcionar, tanto como sea posible, una igualación hidrófoba completa con la zona proteica. Esto conlleva a cambios de curvatura espontánea de la bicapa lipídica acoplada a posibles cambios conformacionales o de distorsión de la proteína de membrana para proporcionar las interacciones más fuertes. Tanto el lípido como la proteína se modifican para favorecer la mejor

interacción, con el resultado de una óptima actividad. De esta manera la función de la proteína es dependiente de la estructura del lípido que la rodea.

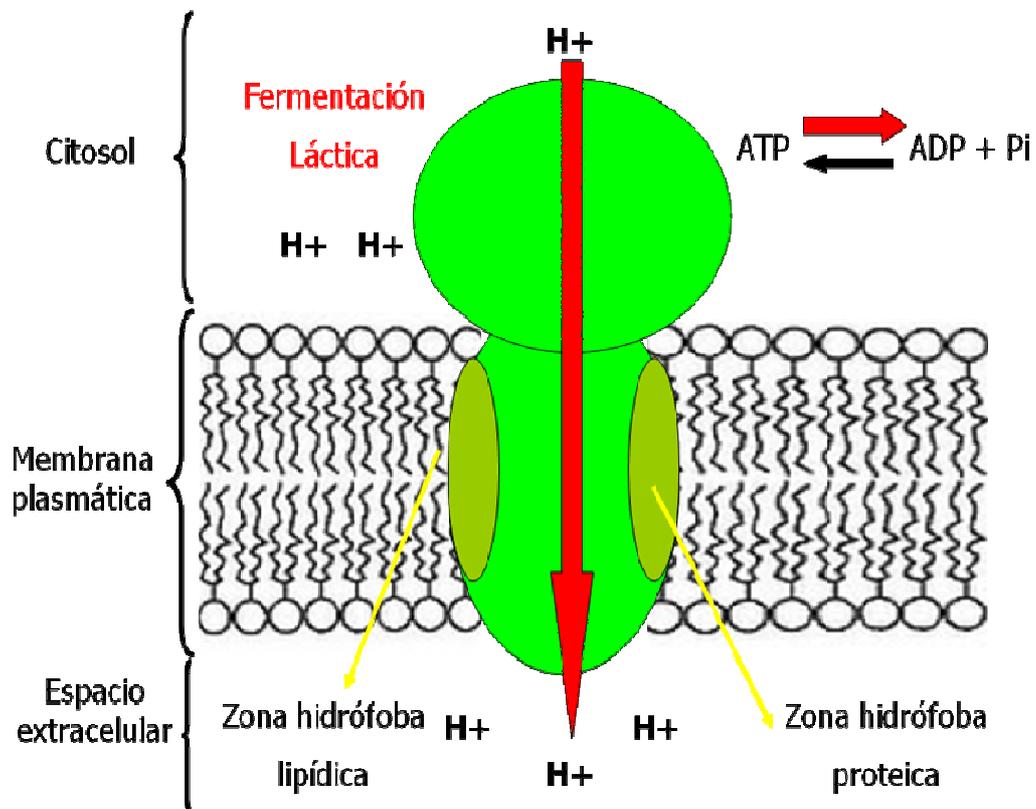
Tomando en conjunto los trabajos de Marsh Derek (Marsh Derek, 1995), y de Lee (Lee, 2004) y nuestros resultados, que muestran una diferente organización de la membrana microbiana según la superficie, ejemplificamos en las Figuras 32 y 33, como podrían interaccionar los lípidos y las proteínas y como dicha interacción podría afectar la actividad enzimática de la ATPasa (factor de virulencia).

En DCSL, el aumento de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (sn-2) mejoraría la interrelación de los mismos con los sectores hidrófobos de la proteína ATPasa, lo cual contribuiría a la mayor actividad enzimática ó expulsión de H^+ al exterior (Figura 32), por lo que en DCSL, el factor de virulencia del *S. mutans* estaría aumentado. Por el contrario, cuando las cadenas de los ácidos grasos de membrana son más cortas y saturadas (sn-1) como en DCSO, podrían producirse espacios o “bolsillos” entre el lípido y la proteína, influenciando el comportamiento de la ATPasa. En este caso las zonas de contacto entre la porción hidrófoba de la proteína y la de los ácidos grasos no estaría totalmente coincidente (Figura 33). Como consecuencia de este desajuste la actividad enzimática estaría disminuida y no se produciría una suficiente expulsión de H^+ al exterior (factor de virulencia disminuido).

Tanto el cambio en el perfil de los ácidos grasos de membrana de *S. mutans* como los cambios de la actividad de la ATPasa total son procesos simultáneos. Es de hacer notar que la relación causal entre los mismos resta aún por demostrar.

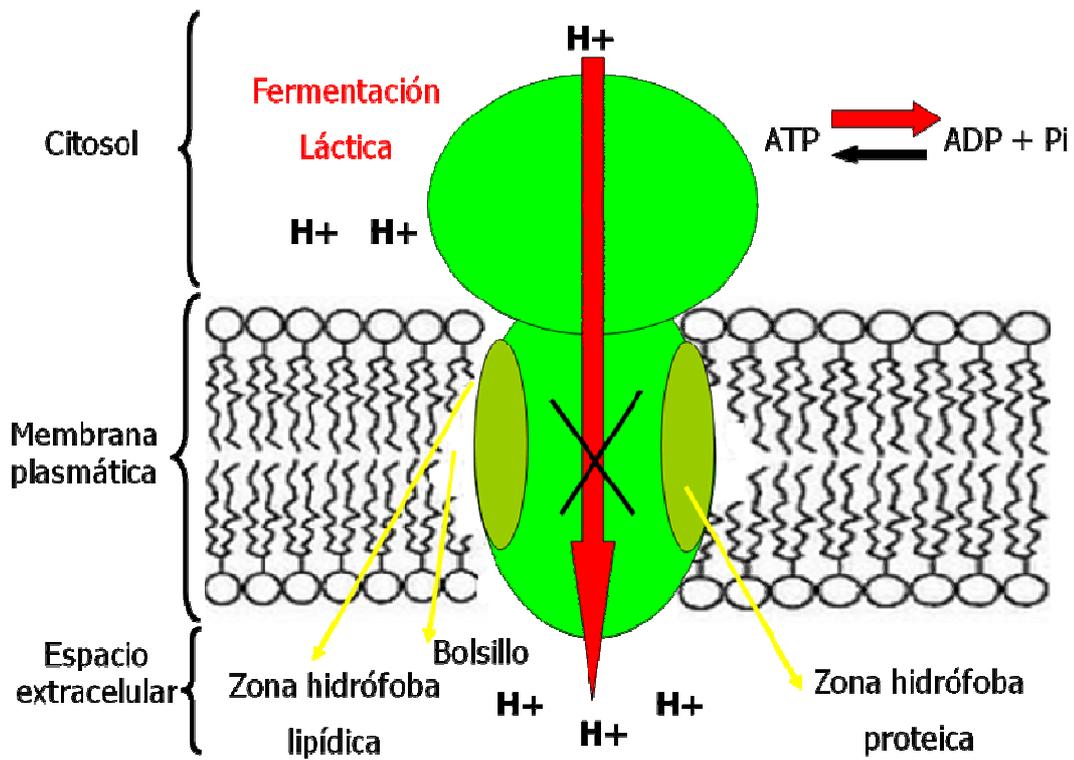
En síntesis, sugerimos que la mayor actividad enzimática en DCSL estaría relacionada a los cambios de la organización de la membrana, inducidos por los cambios en la composición lipídica, que favorecen la mejor interacción entre los segmentos hidrófobos de ambas partes, lípido y proteína.

Figura 32: Modelo hipotético de la interrelación lípido-proteína de DCSL



La zona hidrófoba de las cadenas de acilos coincide con la totalidad de la zona hidrófoba de la proteína. En este caso la funcionalidad enzimática (mayor actividad de la ATPasa) estaría favorecida por el mejor contacto lípido-proteína, que evita distorsiones de ambas partes.

Figura 33: Modelo hipotético de la interrelación lípido-proteína de DCSO



La zona hidrófoba de las cadenas de acilos no coincide totalmente con la zona hidrófoba de la proteína, creando huecos o “bolsillos”, donde la interacción lípido / proteína es deficitaria afectando la actividad de la enzima.

CONCLUSIONES

- Las cepas aisladas de superficies sanas (DSSL y DSSO) se comportaron de manera similar con relación a la cepa de referencia **ATCC**.
- El perfil de los ácidos grasos de membrana de *S. mutans* se diferenció a pH 5, con respecto al desarrollo del microorganismo a pH 7, en todas las muestras.
- En **DCSL**, a pH5, se observó mayores diferencias significativas en ácidos grasos de cadena larga con relación a **ATCC** y **DCSO**, lo que indicaría una diferencia de las cepas autóctonas de *S. mutans* aisladas en este trabajo.
- En **DCSL**, a pH5, se observó mayor diferencias significativas en ácidos grasos insaturados con relación a **ATCC** y **DCSO**, lo que indicaría una diferencia de las cepas autóctonas de *S. mutans* aisladas en este trabajo.
- La relación incremento / disminución de los ácidos grasos de membrana de las cepas estudiadas fue menor comparada con las cepas de referencias **ATCC** utilizadas por otros autores, lo que indicaría características particulares de la cepa autóctona de *S. mutans* utilizada en este trabajo.
- Las muestras controles DSSL y DSSO se diferenciaron, a pH 5 y 7, de la muestra control de referencia **ATCC** por la mayor cantidad de fosfolípidos, lo que indicaría otra diferencia de las cepas autóctonas de *S. mutans* aisladas en este trabajo.
- La estabilidad de la bicapa lipídica en **DCSL** a pH 5, no dependería específicamente del grosor del núcleo hidrofóbico, ni de la longitud del segmento lineal más largo de la cadena ácida sn-2 (insaturada). El factor estabilizante observado a pH 5 parecería depender de la menor diferencia entre longitud de sn-1(saturado) y la longitud de sn-2 (insaturado); indicando un probable mayor contacto y/o interacción entre las cadenas hidrófobas de los fosfolípidos, favoreciendo una mayor rigidez de la membrana.
- El incremento de fosfolípidos en **DCSL**, a pH 5, se correspondería con un aumento de la densidad de las cadenas ácidas. En consecuencia a pH

ácidos la movilidad de las cadenas dentro de la bicapa estaría disminuída, lo que se traduciría como una mayor rigidez u organización de la membrana.

- Los microorganismos desarrollados en **DCSL** expresaron mayor sobrevida ácida y actividad total de la ATPasa en relación a la cepa de referencia **ATCC** y DCSO.
- En resumen, sugerimos que en **DCSL**, los cambios específicos en la organización de la membrana que ocurren a pH 5 favorecería una mejor interacción entre el lípido y la proteína (ATPasa) aumentando la actividad de la misma, lo cual se traduciría como una mayor capacidad cariogénica de los microorganismos crecidos en **DCSL** comparado con los desarrollados en DCSO.

Finalmente es importante remarcar que las investigaciones realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral contribuyen al mejor conocimiento del rol modulador de los lípidos sobre la actividad de la ATPasa (factor de virulencia del *S. mutans*) favoreciendo la mejor comprensión del comportamiento cariogénico de cepas autóctonas en las superficies lisas cariadas.

REFERENCIAS

Aas J A, Griffen A L, Dardis S R, Lee A M, Olsen I, Dewhirst F E, Leys E J, Paster B J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4):1407-17.

Ajdić D, McShan W M, McLaughlin R E, Savić G, Chang J, Carson M B, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 29(22):14434-9.

Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V (ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine.* 4ª edición. Williams & Wilkins. Baltimore. 1996. 52p.

Baelum V, Fejerskov O. Caries diagnosis: a mental resting place on the way to intervention? En: Fejerskov O, Kidd E, editors. *The disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Muksgaard. 2003.101p.

Banas J A. Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in bioscience.* 2004; 9:1267-127.

Becker M R, Paster B J, Leys E J, Moeschberger M L, Kenyon S G, Galvin J L, Boches S K, Dewhirst F E, and Griffen A L . Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(3):1001-1009.

Belli W A, Marquis R E: Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* Acid stress Continuous Culture. *Appl Envirom Microbiol.*1991; 57(4):1134-1138.

Bender G R, Sutton S V W and Marquis R: Acid tolerante, proton permeabilities, and membrana ATPases of Oral Streptococci. *Infect. Immun*1986; 53:331-338.

Bordoni N, Escobar Rojas, Castillo Mercado. Odontología Pediátrica. 1ª edición. Bs. As. Editorial Médica Panamericana. 2010. 167p.

Bowden G H, Hamilton I R. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 1998; 9: 54-85.

Burne R A. Oral streptococci... products of their environment. J Dent Res. 1998; 77(3):445-52.

Calderón R.O, Eynard. A.R. Fatty acids specifically related to the anisotropic properties of plasma membrane from rat urothelium. Biochimica et Biophysica Acta 2000; 36:174-184.

Cantellops D, Reid A P, Eitenmiller R R, Long A R. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. J AOAC Int. 1999; 82(5):1128-39.

de Soet J, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res. 2000; 34(6):486-90.

Driessens F C, Heijligers H J, Wöltgens J H, Verbeeck R M. X-ray diffraction of enamel of a freshly erupted human tooth. J Biol Buccale. 1982; 10 (1):55-61.

Facklam R. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microb Rev. 2002; 15 (4): 613-630.

Fiske C H, SubbaRow. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem. 1925; 66:375-400.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 1957; 226:509-997.

Fozo E M, Quivey R G. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Envir Microbio*. 2004 ; 2(70): 929-936.

Francia C M, Lissera R G, Battellino L J. Película Adquirida Salival: Revisión de la Literatura. *Acta Odontológica Venezolana*. 2007; 45 (3):1-11.

Frank R M. The ultrastructure of caries-resistant teeth. In *Caries-Resistant Teeth*, Ciba Symposium, G.E.W. Wolstenholme y M O'Connor. 1ra ed .Londres. G. and A. Churchill, Ltd.1965. 169p.

Fure S, Romaniec M, Emilson C G, Krasse B. Proportions of *Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Actinomyces* spp in root surface plaque. *Scand J Dent Res*. 1987; 95(2):119-23.

Gavazzi Camargo J C, Hofling J F. Caries lesions increment in Brazilian school children. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1995; 49(1):40-6.

Gold O G, Jordan H V ,J van Houte. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*. 1973; 18: 1357–1364.

Hamada S, Slade H D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutan*. *Microbiol Rev*. 1980; 44 (2):331-84.

Hayes M L. The effects of fatty acid and their monoesters on the metabolic activity of dental plaque. *J Dent Res*. 1984; 63 (1): 2-5.

Heinonen J K, Lahti R J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem*. 1981; 113(2):313-7.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent.* 2004; 28(2):119-24.

Horaud, T., & F. Delbos: Viridans streptococci in infective endocarditis: species distribution and susceptibility to antibiotics. *Eur Heart J.* 1984; 5:39-44.

Jensen M E. Diet and dental caries. *Dent Clin North Am.* 1999; 43 (4):615-33.

Kabara J J; Swieczkowski D M; Conley A J and Truant P J. Fatty acid and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agen Chemo.* 1972; 2: 23-28.

Kenneth R, Applegate K R, Glomset J A. Effect of acyl chain unsaturation on the conformation of model diacylglycerols: a computer modeling study. 1991; 32(10):1635-44.

Keyes P H; Research in dental caries. *JADA.* 1968; 76: 1357-73.

Khoo G, Zhan L, Hoover C, Featherstone JD. Cariogenic virulence characteristics of mutans streptococci isolated from caries-active and caries-free adults. *J Calif Dent Assoc.* 2005; 33(12):973-80.

Kidd EAM, Mejare I, Nyvad B. Clinical and radiographic diagnosis. In: Fejerskov O, Kidd EAM Editorial. *Dental caries. The disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Munksguard. 2003, 111-28 p.

König K J. Dental Morphology in relation to caries resistance with special reference to fissures as susceptible areas. *J. Dent. Res.* 1963; 42: 461-476.

Kuhnert W L, Zheng G, Faustoferri R C, Quivey R G Jr. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J. Bacteriol.* 2004; 186:8524–8528.

Kuramitsu H K. Virulence factors of Mutans Streptococci: Role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med. 1993 ; 4 (2):159-176.

Lambert M A, Moss C W. Cellular Fatty Acid Composition of Streptococcus mutans and Related Streptococci. J Dent Res. 1976; 55(A) 96-99.

Lee A G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochimica Biophysica Acta. 2004; 166: 62– 87.

Lembo F L, Longo P L, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C R, Mayer M P. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries active children. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 313–319.

Li Y, Burne R A. Regulation of the gtfBC and ftf genes of Streptococcus mutans in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiology. 2001; 147(10):2841-8.

Li Y, Navia J M, Caufield P W. Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. Arch Oral Biol. 1994; 39 (12):1057-62.

Liébana J C A, Rodriguez-Avial C. Microbiología Oral. Género *Streptococcus* y bacterias relacionadas. 2^{da} edición. Madrid. McGraw-Hill / Interamericana. 2002. 324p.

Liljemark W F, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med. 1996; 7: 180-198.

Lingström I P, van Ruyven F O J, van Houte J and Kenf R. The pH of Dental Plaque in Its Relation to Early Enamel Caries and Dental Plaque Flora in Humans. J Dent Res. 2000; 79(2): 770-777.

Loesche W J, Grenier E. Detection of *Streptococcus mutans* in plaque samples by the direct fluorescent antibody test. J Dent Res. 1976; 55 (A): 87-93.

Loesche W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Bacteriol Rev. 1986; 50 (4): 353-80.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1):265-75.

Madigan M T, Martinko M J and Parker J. Brock. Biología de los Microorganismos. 10^{ma} edición. Southern Illinois University Carbondale. Editorial: Pearson Educación, S.A. 2004. 66p.

Magalhães P, Paulino T P, Thedei G Jr, Larson R E, Ciancaglini P. A 100 kDa vanadate and lanzoprazole-sensitive ATPase from *Streptococcus mutans* membrane. Arch Oral Biol. 2003; 48(12):815-24.

Magalhães P, Paulino T P, Thedei Jr. G, Ciancaglini P: Kinetic characterization of P-type membrane ATPase from *Streptococcus mutans*. Comparative Biochem and Physiol. 2005; 140 (B):589-597.

Marcelle M N, Lemos J A C., Abranches J, Goncalves R B., Burne R A. Adaptive Acid Tolerance Response of *Streptococcus sobrinus*. J of Bacteriology. 2004; 186 (19):6383-6390.

Marsh Derek. Lipid-protein interactions and heterogeneous lipid distribution in membranes. Mol Membr Biol. 1995; 12 (1):59-64.

Marsh P D. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. 2004; 38:204-211.

Marsh P D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Av Dent Res. 1994; 8: 263-71.

Mason J T, Huang C, Biltonen R L. Calorimetric investigations of saturated mixed-chain phosphatidylcholine bilayer dispersions. *Biochemistry*. 1981; 20(21):6086-92.

Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol*. 1979; 10(4):497-502.

Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 2010; 5(3): 403–417.

Minah G E, Loesche W J. Sucrose Metabolism by Prominent Members of the Flora Isolate from cariogenic and Non-Cariogenic Dental Plaques. *Infect Immun*. 1977; 17:55-61.

Organización Panamericana de la Salud. Salud Oral (OPS). 16 de Julio de 1997. Disponible en la URL. Consultar en <http://www.paho.org/Spanish/gov/cd/doc259.pdf>

Palmer S R, Crowley P J, Oli M W, Ruelf M A, Michalek S M, Brady L J. YidC1 and YidC2 are functionally distinct proteins involved in protein secretion, biofilm formation and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2012; 15 (7):1702-12.

Petersen PE. Sociobehavioural risk factors indental caries – international perspectives. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33: 274–9.

Pitts N B. Clinical Diagnosis of Dental Caries: A European Perspective *Journal of Dental Education*. 2001; 65 (10) 972- 978.

Pitts N B. Diagnostic tool and measurements-impact on appropriate care. *Community Dent Oral Epidemiol*.1997; 25: 24-35.

Quivey R G Jr, Faustoferri R, Monahan K, Marquis R. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2000; 189(1):89-92.

Reich E, Lussi A, Newbrun E. Caries-risk assessment. Int Dent J. 1999; 49(1):15-26.

Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clin Oral Investig. 2003; 7(4):181-8.

Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med. 1994; 5(3-4):203-48.

Shu M, Wong L, Miller J H, Sissons C H. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. Arch Oral Biol. 2000J; 45(1):27-40.

Simmonds R S, Tompkins G R, George R J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. N Z Dent J. 2000; 96: 424-449.

Subramaniam P G, Babu K I, and Nagarathna J. Interdental. Spacing and Dental Caries in the Primary Dentition of 4–6 Year Old Children. J Dent (Tehran). 2012; 9(3): 207-214.

Suzuki T, Tagami J, Hanada N: Role of F₁F₀-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans* GS5. J. Appl. Microbiol. 2000; 88:555-562.

Szabo E I, Amdur B H and Socransky S S. Lipid Composition of *Streptococcus mutans*. Caries Res. 1978; 12:21-27.

Thedei G Jr, Leitão D P, Bolean M, Paulino T P, Spadaro A C and Ciancaglini P. Toluene permeabilization differentially affects F-and P-type ATPase activities present in the plasma membrane of *Streptococcus mutans*. Brazilian J of Med and Biol Res. 2008; 41: 1047-1053.

Tickle Martin, Milsom K M, Donaldson M, Killough S, O'Neill C, Crealey G, Sutton M, Noble S , Greer M and Worthington HV . Protocol for Northern Ireland Caries Prevention in Practice Trial (NIC-PIP) trial: a randomised controlled trial to measure the effects and costs of a dental caries prevention regime for young children attending primary care dental services BMC Oral Health. 2011; 10:11- 27.

Tomita Y, Miyake N, and Yamanaka S. Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience. J Oleo Sci. 2008; 57(2): 115-121.

van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res. 1994; 73: 672-681.

Wang Z Q, Lin H N, Li S, Huang C H. Phase transition behavior and molecular structures of monounsaturated phosphatidylcholines. Calorimetric studies and molecular mechanics simulations. J Biol Chem. 1995; 270(5):2014-23.

Welin-Neilands J, Svenäter. Acid tolerance of biofilms cells of *Streptococcus mutans*. Appl Envir Microbio.2007; 73(17): 5633-38.

Whiley R A, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 1998; 13(4):195-216.

Zaura E, ten Cate J M. Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. Caries Res. 2004; 38 Suppl 1:9-15.

ANEXOS

ANEXO 1

Todas las cepas microbianas, trabajadas en esta Tesis, fueron obtenidas de un estudio de investigación titulado: “Evaluación de la Efectividad de Protocolos de Tratamientos Preventivos en niños con dentición Temporal y Mixta según Criterios de Riesgo Cariogénico”. El protocolo de la investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina sobre Actividades que Involucra a Sujetos Humanos. Los padres y/o tutores de todos los sujetos firmaron el consentimiento informado, después de una explicación detallada del protocolo.

Las cepas de los microorganismos fueron obtenidas de niños de ambos sexo, con $6,2\pm 1,4$ años de edad, de la población de Córdoba, que concurrieron espontáneamente a la Cátedra Integral Niños y Adolescentes, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, razón por la cual son denominadas cepas autóctonas.

A los niños se les realizó una exploración buco dental, efectuada por un profesional competente, matriculado y perteneciente al plantel docente de la Facultad de Odontología. UNC. (Dra María Cecilia Martínez).

Los criterios de inclusión considerados fueron los siguientes:

- Presentar dentición temporal pura y dentición mixta temprana con y sin enfermedad de caries.
- No haber estado sometido a ningún tratamiento preventivo odontológico que pudiera interferir con los resultados
- No haber recibido ningún tratamiento terapéutico durante las dos últimas semanas antes de la recolección de la muestra

Las diferentes zonas fueron secadas con torundas de algodón realizándose la recolección de la biopelícula dentobacteriana de la cara lingual de primeros molares inferiores, con no más de seis meses de erupción, con una sonda periodontal para la superficie libre y con un pequeño cepillo “microbrush” para la zona oclusal de fosas y fisuras.

Se estudiaron los elementos dentarios con diagnóstico de caries de una misma cavidad oral, tomando como control los elementos contralaterales clínicamente sanos (sin signos ni síntomas de lesión cariosa). Para ello se siguieron los criterios de Pitts (Pitts, 1997), los cuales indican que el nivel C₂ son cavidades clínicamente detectables en el esmalte.

ANEXO 2

- ***BOJANICH M A, CALDERÓN R O:** “Relación entre la composición lipídica de membrana y la Actividad de la ATPasa de cepas de *Streptococcus mutans*” XLIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. S.A.I.O. 7-8-9 de Octubre de 2010. Los Cocos. Córdoba. Argentina. **Expositor poster.**
- ***BOJANICH M A, CALDERÓN R O:** “Relación entre la Tolerancia ácida y la Actividad de la ATPasa de cepas de *Streptococcus mutans* en distintas superficies de la lesión cariosa” XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. S.A.I.O. 27-28 y 29 de Octubre de 2011. San Javier, Tucumán. Argentina. **Exposición oral.**
- ***BOJANICH M A, CALDERON R O:** Estudio de la Tolerancia ácida y la actividad de la ATPasa en cepas autóctonas de *Streptococcus mutans* en distintas superficies de la lesión cariosa. III Jornadas de Investigación Científica en Odontología (III JICO). 17,18 y 19 de Noviembre de 2011. (Nº10) Res. HCD N°92/11. **Exposición oral.**
- **Ganadora del 1º Premio del Capítulo Biología Bucal :** Trabajo científico titulado : Estudio de la Tolerancia ácida y la actividad de la ATPasa en cepas autóctonas de *Streptococcus mutans* en distintas superficies de la lesión cariosa, otorgado por ACFO durante las III Jornadas de Investigación Científica en Odontología (III JICO). 17,18 y 19 de Noviembre de 2011. Res. HCD N°92/11
- **Virulencia factors and structural parameters related to *Streptococcus mutans* membrane lipid composition.** M.A.Bojanich, R.O.Calderón. 2013. Enviado para su publicación a la Revista : FEMS Microbiology Letters

