

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

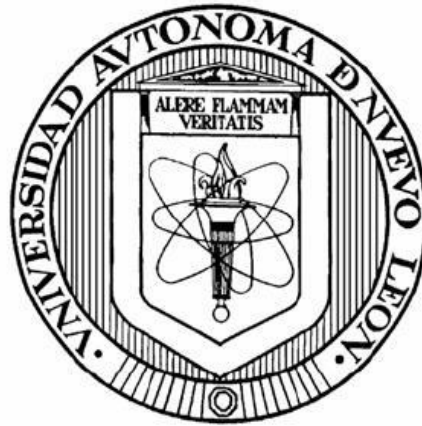
**EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN DE STREPTOCOCCUS  
MUTANS EN LA PRESENCIA DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS Y  
GLUCOSA**

**POR**  
**KARINA GÓMEZ GARCÍA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**AGOSTO, 2016**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN DE *Streptococcus mutans*  
EN LA PRESENCIA DE *Lactobacillus acidophilus* Y GLUCOSA

POR

KARINA GÓMEZ GARCÍA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

AGOSTO, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN DE STREPTOCOCCUS  
MUTANS EN LA PRESENCIA DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS Y  
GLUCOSA**

**POR**  
**KARINA GÓMEZ GARCÍA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**AGOSTO, 2016**

Expresión de los genes de adhesión de *Streptococcus mutans* en la presencia de  
*Lactobacillus acidophilus* y glucosa

Comité de Tesis

---

DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG

Presidente

---

DRA. KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO

Secretario

---

DR. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

Vocal

---

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ

Vocal

---

DRA. LILIA MORALES RAMOS

Vocal

Expresión de los genes de adhesión de *Streptococcus mutans* en la presencia de  
*Lactobacillus acidophilus* y glucosa

Dirección de Tesis

---

DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG

Director de Tesis

---

DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

Director Externo

Expresión de los genes de adhesión de *Streptococcus mutans* en la presencia de  
*Lactobacillus acidophilus* y glucosa

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por el don de pensar, por poner en el camino a cada una de las personas que hicieron posible el concluir esta tesis.

A la Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos, por su amistad, paciencia, tiempo donado, apoyo incondicional, facilidades en todo el tiempo que ha transcurrido a lo largo de los años, pero sobre todo por el empuje y confianza que siempre me ha brindado.

Al Dr. Luis Jesús Galán Wong por todas las oportunidades brindadas al recibirme en el Instituto de Biotecnología de la UANL, además de las varias revisiones realizadas durante la escritura de tesis.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por aceptarme como alumna de doctorado, apoyarme y confiar en mí.

A mi esposo Sergio Alfredo Castillo Cantú, por su paciencia, por todo el apoyo y consuelo que me dio en este difícil camino.

A mis padres Alma, Clemente, Laura y Alfredo, por cuidar a mis hijos en repetidas ocasiones para que yo pudiera avanzar, además del apoyo emocional que también me proporcionaron.

Al Dr. Víctor Eustorgio Aguirre Arzola por ser mi maestro, por tantas cosas que aprendí de él.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, a mi Esposo e hijos. Tardé varios años en terminar y muchos obstáculos se me presentaron en el camino, varias veces hasta renuncié a concluir, pero al final ellos fueron mi motor, ya que quiero ser siempre un ejemplo positivo para cada uno de ellos.

“Deja tu afición a las primeras piedras y pon la última en uno solo de tus proyectos”.

San Josemaría Escrivá

Camino 42



## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## TABLAS DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Páginas</b>
0. Resumen.....	12
1. Introducción.....	14
2. Definición del problema y justificación.....	18
3. Objetivos.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Antecedentes.....	21
6. Materiales y Métodos .....	32
7. Resultados.....	39
8. Discusión.....	40
9. Conclusiones.....	41
10. Perspectivas.....	42
11. Tablas.....	43
12. Figuras.....	45
13. Referencias.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1.....	35
Tabla 2.....	35
Tabla 3.....	36
Tabla 4.....	37
Tabla 5.....	43
Tabla 6.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

*Sm* *Streptococcus mutans*

*La* *Lactobacillus acidophilus*

**Ag** Antígeno

*Gtf* nombre del gen que codifica para la enzima extracelular glucosiltransferasa

*ftf* nombre del gen que codifica para la enzima extracelular fructosiltransferasa

*spaP* nombre del gen que codifica para una proteína antigénica denominada *spaP* de *S. mutans*.

**Quorum sensing:** es la regulación de la expresión de los genes en respuesta a fluctuaciones en la densidad de la población celular. Las bacterias producen y liberan señales químicas moleculares llamadas auto inductores que aumentan en la concentración como una función de la densidad celular.

**qPCR** Reacción de cadena en polimerasa.

**gp-340** glucoproteína aglutina saliva.

**Gbp** proteínas de unión a glucano.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	45
Figura 2.....	45

## RESUMEN

*Streptococcus mutans* es la bacteria más frecuentemente asociada con la caries dental. Uno de sus factores de virulencia, es la capacidad para formar biopelículas. *gtf*, *ftf* y *SpaP* son genes de *Streptococcus mutans* que están relacionados con la adhesión y colonización de las superficies dentales y la formación de biopelículas. Los expopolisacáridos son catalizados por un grupo de enzimas bacterianas glucosiltransferasas (GTF) y fructosiltransferasas (FTF), que codifican para los genes *gtf* y *ftf* respectivamente, los cuales, en ciertas condiciones pueden estar fuertemente asociados con células de la superficie. El antígeno SpaP, que codifica para el gen *SpaP* es una adhesina multifuncional considerada como el factor mediador primario que ayuda al *Streptococcus mutans* a adherirse al esmalte en la ausencia de sacarosa. *Lactobacillus acidophilus* es uno de los patógenos asociados con la caries dental; en la cavidad oral se aísla preferentemente en la saliva, el dorso de la lengua y las placas supragingivales y radiculares, especialmente los homofermentativos son los que se relacionan con esta enfermedad. El objetivo de esta investigación es determinar si la presencia de glucosa y *Lactobacillus acidophilus* promueve mecanismos de adhesión que incrementan la expresión de los genes *gtf*, *ftf* y *SpaP* de *Streptococcus mutans*. Se observó que *S. mutans* redujo sus genes de adherencia principalmente *ftf* en presencia de 40 % de glucosa, además los iniciadores específicos puros de *S. mutans* (*gtf*, *ftf* y *spaP*) redujeron su señal de expresión cuando estaban acompañados de 40% de glucosa y en la proporción 1:10 *Sm/ La*. El gen *spaP* se sobre expresó en la presencia y ausencia de glucosa.

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* is the bacteria most frequently associated with dental caries. One of its virulence factors is its ability to form biofilm. *gtf*, *ftf* and *SpaP* are genes of *Streptococcus mutans* that are involved in adhesion and colonization of teeth surfaces and therefore biofilm formation. Exopolysaccharides are catalyzed by a group of bacterial enzymes termed glycosyltransferases (GTF) and fructosyltransferases (FTF), encoded by the genes *gtf* y *ftf* respectively, which under certain conditions can be strongly associated with cell surfaces. The *SpaP* antigen encoded by the gen *SpaP* is a multifunctional adhesin consider as the main factor that helps *Streptococcus mutans* to adhesive enamel in the absence of sucrose. *Lactobacillus acidophilus* is one of the pathogens associated with *Streptococcus mutans*, that it is isolated from saliva, dorsum of the tongue, supragingival and root plaque, especially the homofermentative who are related whit this disease. We carried out research to determine wether the presence of glucose and *Lactobacillus acidophilus* promote adhesion mechanisms that increase the expression of *gtf*, *ftf* and *SpaP* of *Streptococcus mutans*. We found that adherence genes of *S. mutans* down regulated mainly *ftf* in the presence of glucose 40%, indeed the especific primers *gtf*, *ftf* and *SpaP* reduce the signal expression when it were 40% glucose in ratio 1:10 *Sm/La*. The gen *SpaP* upregulated in the presence and absence of glucose.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucodentales como la caries dental, la periodontitis y los cánceres de boca y faringe son un problema de salud de alcance mundial que afectan a los países industrializados y en especial entre las comunidades más pobres. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido de caries dental.

Los efectos de las enfermedades bucodentales en términos de dolor, sufrimiento, deterioro funcional y disminución de la calidad de vida son considerables y costosos. Se estima que el tratamiento representa entre el 5% y el 10% del gasto sanitario de los países industrializados y está por encima de los recursos de muchos países en desarrollo.

Una mala salud bucodental puede tener profundas repercusiones en la salud general y en la calidad de vida. El dolor, los abscesos dentales, los problemas al comer o en la masticación, la pérdida de piezas y la existencia de piezas descoloridas o dañadas tienen efectos importantes en la vida y el bienestar cotidiano de las personas (“OMS | La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales,” n.d.).

*Streptococcus mutans* es el agente etiológico más importante relacionado con la caries dental en humanos (Mattos-Graner, Li, Caufield, Duncan, & Smith, 2001; Napimoga *et al.*, 2004). Es uno de los problemas de salud pública más frecuente en el mundo, que podría comprometer en general a la salud a través de los años (Allukian, 2000). Es un microorganismo Gram positivo, acidogénico, que fermenta glucosa, lactosa y manitol, es catalasa positivo y puede metabolizar la sacarosa (Hamada & Slade, 1980). Su principal factor de patogenicidad es su capacidad de adherirse a superficies sólidas y formar biopelículas (Paes Leme, Koo, Bellato, Bedi, & Cury, 2006).



Posee una gran variedad de factores de virulencia que le permiten establecerse en la cavidad oral y así producir la enfermedad. Esta bacteria sintetiza largas cantidades de glucanos y fructanos extracelulares a partir de la sacarosa utilizando las glucosiltransferasas y fructosiltransferasas, adhiriéndose tenazmente a las superficies cubiertas de glucano y gracias a sus factores de virulencia acidogénica, acidúrica y ácido tolerante es un participante clave en la formación de la matriz extracelular de polisacáridos en la biopelícula cariogénica (Klein *et al.*, 2009).

Las biopelículas orales son estructural y composicionalmente comunidades complejas bacterianas. Más de 750 de especies y filotipos diferentes de bacterias han sido identificadas en la placa dental madura. Las intra e interacciones entre especies, se cree que juegan un papel crucial en la dinámica de las comunidades contribuyendo a la formación de placa y finalmente al desarrollo de enfermedades polimicrobianas incluyendo caries y periodontitis. Por lo tanto, un mejor entendimiento de las interacciones célula – célula entre patógenos orales y bacterias comensales y el impacto de estas en la expresión de factores de virulencia y patogenicidad podría llevar al desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas contra la caries dental y la enfermedad periodontal.

*Streptococcus mutans* ha desarrollado múltiples mecanismos para colonizar las superficies dentales, entre ellos un antígeno de proteína que pertenece a la familia Ag I/II. Uno de estos antígenos es SpaP, que codifica para el gen *SpaP*, adhesina multifuncional considerada como el factor mediador primario que ayuda al *Streptococcus mutans* a adherirse al esmalte en la ausencia de sacarosa, contribuyendo así a desarrollar una comunidad microbiana o biopelícula cariogénica, favoreciendo así la adherencia, ya que interactúa con un gran número de sustratos (Ono *et al.*, 1994a). *S. mutans* también produce glucosiltransferasas (*gtf, ftf*) que polimerizan la mitad de la sacarosa y del almidón de los carbohidratos en glucanos. La unión de glucanos por unión de proteínas que se unen al glucano (*Gbp*) facilita la

adherencia bacteriana por las glucosiltransferasas a la superficie dental y la adhesión interbacteriana y la acumulación de biopelículas.

Las glucosiltransferasas y los glucanos, más la matriz adhesiva extracelular constituyen la vía dependiente de la sacarosa del *Streptococcus mutans* para establecerse en la superficie dental y son de principal importancia en la formación de placa dental y caries. (Wen, Yates, Ahn, & Burne, 2010)

*Lactobacillus acidophilus* es uno de los patógenos asociados con *S. mutans*, el cual forma parte de los diversos microorganismos no cariogénicos (Marsh, 2003). Los Lactobacilos pueden producir ácidos orgánicos que descalcifican la matriz de la dentina, estos se han aislado de caries profundas y superficiales (Byun et al., 2004). En la cavidad oral, los lactobacilos constan menos del 1% de la microbiota total cultivable. Ciertamente los lactobacilos se pueden encontrar en la leche materna, lo que sugiere una exposición temprana de esta bacteria con la cavidad oral (Haukioja, 2010), Además, en un estudio realizado por (Martin, Nadkarni, Jacques, & Hunter, 2002) se encontró que *Lactobacillus* sp. era numéricamente la especie dominante en las caries de dentina. Sin embargo, la presencia de Lactobacilos, retrasa la expresión de genes de adherencia y la acumulación de glucosa (Rooj, Kimura, & Buddington, 2010) Probablemente deben competir con el *S. mutans* por el sustrato reduciendo así el riesgo de caries (Baca-Castañón et al., 2015)

El número total de bacterias y la composición de la microbiota oral, asociado con las cavidades cariosas, puede ser un indicador individual del riesgo e incidencia de la caries dental. Las bacterias involucradas en el inicio y desarrollo de esta enfermedad son principalmente *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Marsh, 2003). Sin embargo, factores ambientales como la presencia de azúcar, bacterias del grupo mutans que no fermentan los carbohidratos y promueven la homeostasis del pH que desmineraliza el esmalte, pueden cambiar la composición bioquímica de la biopelícula dental (Takahashi & Nyvad, 2011). En estas condiciones el *S. mutans* es capaz de crecer incrementando sus factores de adhesión, debido a su habilidad metabólica de descomponer los carbohidratos de la dieta, de los cuales obtiene una gran cantidad de ácidos orgánicos (acidogénesis) y con su capacidad de sobrevivir en

un ambiente de estrés, específicamente de un pH muy bajo (acidúrico) (Lemos & Burne, 2008)

El propósito de este estudio es evaluar si *Lactobacillus* sp. puede positiva o negativamente influenciar la virulencia de una bacteria, así como determinar si la presencia de glucosa y *Lactobacillus acidophilus* promueven la adhesión de mecanismos que incrementan la expresión de los genes *gtf*, *ftf* y *SpaP* de *S. mutans*.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la OMS las afecciones dentales son un problema de salud importante en la actualidad ya que más del 90% de la población mundial sufre al menos de un problema dental.

Las caries en la infancia, es una de las causas principales de consulta, ocupando el primer lugar de frecuencia en niños menores de 10 años, y esta se encuentra íntimamente relacionada a falta de higiene y a el consumo excesivo de azúcares refinados.

Está bien documentado que la ausencia de higiene, promueve el acúmulo de bacterias en los diferentes sitios anatómicos, incrementando el riesgo de la caries dental.

Por otra parte, el *Quorum Sensing* es uno de los mecanismos de comunicación interbacteriana que sucede con facilidad cuando se acumulan bacterias e incrementan en densidad, y estos aumentan la regulación de genes de la expresión de genes de virulencia de muchos gérmenes.

Por lo anterior en este estudio nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación:

¿De qué manera las diferentes concentraciones de azúcares y bacterias pueden influir en el medio ambiente bucal?, provocando que las bacterias relacionadas con la caries dental, modifiquen el patrón de expresión de los genes *ftf*, *gtf* y *SpaP*, los cuáles están relacionados con adhesión y formación de biopelículas en la superficie dental y facilitan el desarrollo de la caries.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1.-General

Evaluar la actividad de los genes *gtf*, *ftf* y *SpaP* en un modelo de biopelícula estático con glucosa en presencia de *Lactobacillus acidophilus*.

#### 3.2.-Especificos

- 1.1 Diseñar marcadores moleculares específicos para los genes *gtf*, *ftf* y *spaP*.
- 1.2 Activación de las cepas de *S. mutans* UA159 (ATCC 700610) para prueba de especificidad de los marcadores moleculares.
- 1.3 Desarrollo del modelo de biopelícula estático en presencia de *L. acidophilus* bajo una concentración de glucosa a diferentes concentraciones 1:1, 1:10, 10:1
- 1.4 Medir la expresión de los genes *gtf*, *ftf* y *spaP* mediante qPCR

## **4. HIPÓTESIS**

La concentración de *L. acidophilus* y la presencia de glucosa afecta la expresión de genes de adherencia y de virulencia en *S. mutans*.

## 5. ANTECEDENTES

### GÉNERO ESTREPTOCOCOS CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se presentan morfológicamente como cocos grampositivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas. Son aerobios, aunque pueden desarrollarse en condiciones anaerobias, a veces incluso mejor que en aerobiosis. Carecen de catalasa y su tolerancia al oxígeno se debe a peroxidasas flavínicas y pseudocatalasas.

Presentan un metabolismo fermentativo y producen esencialmente ácido láctico (homofermentativos); la génesis de ácidos puede ser tan importante que el descenso del pH provocaría su autólisis.

Su temperatura óptima de desarrollo es de  $36 \pm 1$  °C y en relación con las condiciones de cultivo son muy variables, desde los más exigentes hasta los que incluso se desarrollan en condiciones hostiles.

Con respecto al hombre los hay patógenos y oportunistas que forman parte de la microbiota normal.

En su estructura, además del ADN cromosómico, citoplasma, mureína o peptidoglucano y membrana citoplasmática, presenta: *Ácidos teicoicos* y *lipoteicoicos*: íntimamente ligados al peptidoglucano. Tienen un carácter antigénico e intervienen en procesos de adhesión. *Carbohidratos de la pared celular*: poseen también carácter antigénico e intervienen en procesos adhesivos, de agregación y coagregación bacteriana. *Proteínas de la pared celular*: asociadas a la mureína, tienen funciones distintas, unas presentan carácter antigénico, otras actividades enzimáticas como glucosil y fructosil transferasas, algunas se comportan como adhesinas fijándose a superficies blandas de forma individual, o a superficies duras, a través de receptores de película adherida, otras actúan como elementos receptores de glucanos o interfieren en la activación del complemento. *Fimbrias*: intervienen en la

adhesión a tejidos del hospedador y en los fenómenos de agregación y coagregación bacteriana. *Cápsula*: constituida a expensas de ácido hialurónico o polisacáridos.

*Capa mucosa*: constituida por polisacáridos extracelulares, de los tipos glucanos, fructanos o ambos, es de gran importancia en los fenómenos adhesivos, especialmente en la formación de placas dentales y en la ecología de la cavidad oral.

*Streptococcus mutans* se aísla en el 70 – 90% de la población no desdentada y resistente a la caries. En individuos con caries activa, su cantidad aumenta. Microorganismo cariogénico por excelencia. Por su especial capacidad de colonizar superficies duras, se aísla en la cavidad oral, sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva. Presenta también un papel importante en las endocarditis subagudas.

En su estructura antigénica posee los polisacáridos parietales c, e y f y proteínas asociadas a la mureína conocidas como antígeno I/II. Estas proteínas participan en procesos adhesivos y como glucosiltransferasas y receptoras de glucanos en fenómenos agregativos y coagregativos entre bacterias que colonizan los dientes (Liébana Ureña, 2002).

## **EL ROL DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN LA CARIES DENTAL**

La caries dental es una enfermedad infecciosa, crónica transmisible, muy prevalente en el ser humano, que se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, por la acción de los ácidos producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes (Liébana Ureña, 2002).

La etiología de la caries dental es multifactorial, sin embargo el consumo frecuente de azúcares refinados, principalmente la sacarosa, aumentan la capacidad de adherencia de este microorganismo a las piezas dentales (Rudney *et al.*, 2015).



El genoma de *Streptococcus mutans* UA159 serotipo c ha sido completamente secuenciado, y está compuesto de 2, 030,936 pares de bases. Contiene 1963 marcos de lectura abierta de los cuales 63% tiene funciones puntuales.

Por décadas, estudios epidemiológicos, bioquímicos y en animales han implicado al *S. mutans* como el principal agente causal de la caries dental en humanos. La caries dental, enfermedad infecciosa que afecta a los seres humanos, tiende a permanecer sin tratamiento en muchas zonas subdesarrolladas, ocasionando un considerable sufrimiento que solo se alivia con la pérdida o extracción de la pieza dental infectada.

Aunque se ha encontrado que de 200 a 300 especies bacterianas están asociadas con la placa dental, sólo la presencia de *S. mutans* ha sido ligado con la formación de caries dental (Ajdić *et al.*, 2002).

*Streptococcus mutans* juega un rol importante en el desarrollo de la caries dental en animales y en humanos. Muchas investigaciones sobre este microorganismo se han realizado en los últimos años, sin embargo, *S. mutans* no es la única especie que participa de manera independiente (Hamada & Slade, 1980).

## **POTENCIAL DE LAS BACTERIAS COMENSALES DE COMPORTARSE COMO PATÓGENOS**

Varios cientos de especies de bacterias residen en la cavidad oral. La mayoría son benignas, no causan enfermedad conocida en la boca y los tejidos circundantes y coexisten de manera pacífica con el huésped y los comensales. Cuando estas bacterias entran en la sangre y otros compartimientos sistémicos, los genes expresados de manera constitutiva pueden ser suficientes para generar patogenicidad, por ejemplo, en un microorganismo comensal oral como *Streptococcus sanguinis*. En 1948, el eminente microbiólogo Theodor Rosebury, en ese entonces en la Universidad de Columbia, identificó los estreptococos orales como “patógenos endógenos” capaces de causar enfermedad en un ambiente no nativo. El que las bacterias orales dependan

sólo de genes expresados de manera constitutiva para causar enfermedad en compartimientos no nativos es decir, ambientes distintos a los de la cavidad oral, resulta en ocasiones confuso, de hecho, los estreptococos orales pueden expresar determinados genes sólo cuando infectan superficies intravasculares, y los productos de estos genes expresados *in vivo* pueden contribuir a producir una enfermedad sistémica.

La virulencia microbiana puede cambiar cuando nuevos ambientes de estrés influyen en el patrón de genes expresados. En efecto, con la transición a un nuevo ambiente, la supervivencia puede requerir la expresión regulada de genes. En algunos casos, la expresión de genes regulados por el ambiente puede incrementar el potencial patogénico o hacer que un comensal inofensivo se comporte como patógeno. Para asegurar la supervivencia en un ambiente extraño, es posible que bacterias comensales benignas estén genéticamente programadas para hacerse virulentas.

A fin de sobrevivir en un ambiente fuera de la cavidad oral estresante, las bacterias orales suelen colonizar un nicho relativamente hospitalario en un sitio anatómico anormal o lesionado o un huésped inmunodeficiente. De manera alternativa, las infecciones orales de células y tejidos sanos en el compartimiento sistémico causarían patología subclínica o se superpondrían de manera secundaria a otra enfermedad subclínica. Las bacterias orales, como las especies de estreptococos *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mutans* y *S. salivarius*, se han aislado de sitios anatómicos distintos en infecciones sistémicas. Pruebas recientes sugieren que estos estreptococos orales también pueden actuar como patógenos accesorios, que incrementan la virulencia de patógenos conocidos con los que pueden interactuar en comunidades microbianas heterotípicas. Dados estos escenarios, varios mecanismos pueden facultar a las bacterias orales para hacerse virulentas y causar enfermedad al infectar órganos y tejidos sistémicos.

La caries dental es muy frecuente en los países industrializados, donde el consumo de azúcar refinado es muy alto. No es sorprendente que el patógeno más estudiado,

*Streptococcus mutans*, sea reconocido como una máquina procesadora de glucosa en extremo eficiente, que utiliza funciones extracelulares y metabolismo intracelular para fermentar los azúcares comunes en la alimentación. En particular la sacarosa, el azúcar de mesa común, es útil para el microorganismo. Los primeros estudios con voluntarios humanos y con modelos animales mostraron de manera concluyente que la colonización irreversible de la boca por *Streptococcus mutans* sólo ocurría en presencia de sacarosa y no en presencia de azúcares monoméricos.

Algunos años más tarde, después del advenimiento de técnicas moleculares, se hicieron más claras las razones por las cuales la adhesión a la superficie dental y el desarrollo de la biopelícula dependían de sacarosa.

El interés por *S. mutans* como agente causal de la caries dental surgió debido a su alta correlación en enfermedades de estudios epidemiológicos en niños y, su capacidad demostrada de proliferar en valores de pH ácido *in vitro* y producir con rapidez grandes cantidades de exopolisacáridos insolubles, además de su capacidad de formar caries dental en modelos animales. Dos propiedades clave de la fisiología de *S. mutans* caracterizan su participación en la enfermedad dental. La primera es que metaboliza con facilidad la sacarosa de los alimentos para formar polímeros de glucosa insolubles (glucanos). Éstos, ayudan a la colonización permanente de superficies duras y al desarrollo de la matriz de sustancia polimérica extracelular *in situ*, lo que lleva a la formación de biopelículas muy adhesivas y cohesivas. La segunda propiedad es que *S. mutans* puede sobrevivir a valores de pH ácidos que son letales para la mayoría del resto de las especies bacterianas presentes en la boca. De hecho, el microorganismo es capaz de utilizar una gran variedad de azúcares, que son metabolizados con rapidez a ácidos orgánicos. La capacidad de adaptarse a condiciones ácidas es un atributo clave del potencial patógeno del microorganismo. En presencia de altas concentraciones de azúcar, el ácido que más se produce es el ácido láctico. Éste acidifica con rapidez la biopelícula, de lo que resulta la selección

de microbiota altamente acidógena y acidúrica. Si las bacterias no se eliminan de la superficie dental, se forma una placa cariogénica, esto implica la acumulación e interacción de células microbianas, además de proteínas salivales y partículas de alimento, con aumentos simultáneos en la retención de placa y producción de ácido.

### **COLONIZACIÓN DE LA CAVIDAD ORAL POR *STREPTOCOCCUS MUTANS***

*S. mutans* y *S. sobrinus* colonizan las superficies duras de la cavidad oral. Mientras que otras especies de estreptococos pueden colonizar las superficies mucosas así como las del esmalte, al parecer *S. mutans* sólo coloniza las superficies de tejidos duros. Por supuesto, se desprenden bacterias hacia la saliva, y las muestras salivales son la base de las estimaciones rápidas de portación de *S. mutans* en niños.

El proceso de colonización puede dividirse en tres fases: a) adhesión de células bacterianas a la película salival, b) formación de microcolonias que expresan moléculas señal y sustancia polimérica extracelular y c) acumulación de bacterias cementadas por polisacáridos (y glucoproteínas salivales).

La adhesión inicial de *S. mutans* a la superficie dental implica la acción de una importante proteína adhesina de superficie llamada antígeno I/II(Ono *et al.*, 1994b). Ésta es producida por todas las cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* que se han examinado, y la adhesina reconoce glucoproteínas presentes en la saliva como moléculas receptoras. El factor salival por el que el antígeno I/II tiene la máxima afinidad es una glucoproteína llamada aglutinina salival. Ahora se le conoce como gp-340 (glucoproteína con masa molecular de 340 kDa), también se encuentra en las lágrimas y es secretada por el epitelio pulmonar e intestinal. La principal función de la aglutinina salival es agregar bacterias y virus de modo que puedan ser eliminados, al ser fagocitado por macrófagos. Sin embargo, cuando la proteína aglutinina (gp-340) se deposita en la superficie dental, actúa como receptor de la proteína antígeno

I/II y promueve la adhesión de *S. mutans*. El antígeno I/II se une a la pared celular estreptocócica mediante el extremo carboxilo terminal de la proteína, y forma una estructura alargada hecha por una región base globular, un tallo o pedúnculo y una cabeza. Se ha demostrado que cada una de estas regiones reacciona con gp-340, lo cual sugiere que sería posible que las bacterias fueran agregadas por gp-340 mientras están unidas a ella, formando microcolonias.

El interés en la proteína antígeno I/II ha sido sostenido porque las secuencias peptídicas derivadas de la región amino terminal del polipéptido pueden usarse para vacunar roedores y conferirles protección contra la colonización por *S. mutans* y la posterior caries dental. Además, el anticuerpo monoclonal que reacciona con una parte de la región del cuello del antígeno I/II se ha usado en estudios de inmunización pasiva para proteger a voluntarios humanos contra la recolonización por *S. mutans*.

## **PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS**

*S. mutans* sintetiza y secreta cuatro enzimas extracelulares, llamadas glucosiltransferasas (*gtf*) y fructosiltransferasa (*ftf*). Estas enzimas desdoblan (hidrolizan) sacarosa en glucosa y fructosa y al mismo tiempo forman polímeros de glucosa (glucanos) o fructosa (fructanos), respectivamente. Hay tres glucosiltransferasas de *S. mutans*, designadas *gtfB*, *gtfC* y *gtfD*. Éstas son diferentes en cuanto a que una de las enzimas, la *gtfB* forman glucanos insolubles con predominancia de enlaces  $[[\alpha]]1,3$  entre los monómeros glucosa. *GtfC* produce una mezcla de glucanos insolubles y solubles (ricos en enlaces  $[[\alpha]]1,6$ ), mientras que *gtfD* produce principalmente glucanos solubles. La *ftf* cataliza la síntesis de un polímero de fructano, que es soluble y sirve como una reserva de energía extracelular fácil de metabolizar. Las enzimas *gtf* contienen dos dominios; uno posee actividad de síntesis de glucano y el otro actúa como un dominio de unión a glucano. En términos de mecanismo, el dominio catalítico hidroliza sacarosa, y la glucosa producida se agrega a una cadena de glucano unida al dominio de unión a glucano. Por lo tanto, las

enzimas pueden considerarse polimerasas, que añaden residuos glucosilo o fructosilo a iniciadores glucano o fructano. La función de estas enzimas es producir polisacáridos extracelulares que en potencia constituyen un depósito de carbohidrato el cual puede utilizarse cuando las condiciones nutricionales son desfavorables. Los polisacáridos más solubles pueden ser degradados con rapidez por enzimas dextranasa para producir glucosa destinada a la generación de energía. Los polisacáridos menos solubles cementan las células entre sí formando una matriz.

La acumulación de *S. mutans* en una biopelícula resistente requiere la actividad de un tercer grupo de factores proteínicos designados proteínas de unión a glucano (*Gbp*). La función de estas proteínas es mantener cerca de la superficie celular bacteriana los polisacáridos que han sido sintetizados por las enzimas *gtf*. A la fecha se han identificado cuatro *Gbp*, designadas *GbpA* a *GbpD*.

La producción de *Gbp* es esencial para que *S. mutans* forme una biopelícula o se acumule como una placa, porque esas enzimas de manera eficaz establecen enlaces cruzados en las células bacterianas al unir glucanos extracelulares. Se ha demostrado que *GbpA*, *GbpB* y *GbpC* son necesarias para la producción de caries en modelos de roedor. La función principal de *GbpB* en el proceso de desarrollo de caries es sugerida por observaciones de que la inmunización de roedores con dominios selectos de *GbpB* protege contra la colonización por *S. mutans*.

Las enzimas *gtf*, derivadas de estreptococos, se encuentran en la saliva y se absorben con facilidad en películas experimentales y en superficies celulares bacterianas. Entonces son capaces de sintetizar glucanos a partir de sacarosa disponible y de este modo proporcionar sitios de adhesión adicionales para estreptococos que expresen *Gbp* en su superficie. Aunque las tres enzimas *gtf* pueden unirse a la película, sus afinidades son muy distintas; *gtfC* exhibe la unión más fuerte. *S. mutans*, y otros

microorganismos orales, se unen con avidez a superficies cubiertas de glucano, en particular las sintetizadas *in situ* por *gtfB* y *gtfC*, a través de interacciones con *Gbp* asociadas a la célula. La síntesis simultánea de glucanos por *gtfB* adsorbida a superficie y *gtfC* favorece la adhesión bacteriana y fomenta la agregación y acumulación de células bacterianas. Esto, aunado a datos que demuestran alteración del desarrollo normal de la biopelícula e inducción de caries por cepas mutantes con defectos de *Gbp* y *Gtf*, lleva a la conclusión inevitable de que la producción de glucano y la unión a éste son elementos críticos del proceso infeccioso de *S. mutans*. Es interesante el que las enzimas *gtf* no se expresan de manera constitutiva, sino que se producen en mayores concentraciones durante el desarrollo de las bacterias a pH bajo, una condición que también promovería la disolución del esmalte y el inicio de lesiones cariosas.

## **GÉNERO LACTOBACILOS**

En este género incluido en la familia *Lactobacillaceae* se distinguen más de 40 especies, que de acuerdo con sus actividades metabólicas sobre los hidratos de carbono se clasifican en tres grupos: Homofermentativos: Son los que a partir de la glucosa siguen la vía de la glucólisis, y desde el piruvato, mediante la lactato deshidrogenasa originan únicamente lactato sin producción de CO<sub>2</sub>. Las especies más importantes en el grupo de la cavidad oral son *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. gasseri* y *L. crispatus*. Heterofermentativos estrictos: carecen de adolasa y no pueden seguir la vía glucolítica completa. El resultado final es la producción de acetato, etanol, formiato (poseen piruvato formiato liasa), lactato y CO<sub>2</sub>. Las especies más representativas en la cavidad oral son: *L. fermentum* y *L. brevis*. Heterofermentativos facultativos: no siguen la ruta de las pentosas fosfato desde el inicio, en presencia de gluconato se comportarían como los heterofermentativos estrictos produciendo acetato, etanol, formiato, lactato y CO<sub>2</sub>. en presencia de glucosa la utilizan como los

homofermentativos. Las especies más representativas en cavidad oral son *L. casei* y *L. plantarum*.

En cuanto a los cultivos, la temperatura óptima es de  $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$  y existe un medio líquido o sólido muy selectivo y que salvo algunas excepciones solo permite el desarrollo de estos microorganismos, el Rogosa Mitchell-Wiseman, que contiene 3 azúcares glucosa, sacarosa y arabinosa, entre otras sustancias. Las colonias a las 48 horas son convexas, lisas, circulares y con bordes regulares. En caldos suelen originar turbidez homogénea y depósitos en el fondo. Los cultivos desprenden un olor típico a leche fermentada.

Con respecto a su hábitat, las especies del género *Lactobacillus* se encuentran en forma constante en la cavidad oral, la vagina y el aparato digestivo humano y en otros mamíferos. En la vagina tienen un efecto beneficioso, especialmente en la mujer en edad fértil, degradan el glucógeno, producen ácidos, disminuyen el pH, y de esta forma interfieren en la colonización de otros microorganismos patógenos.

En la cavidad oral se aíslan preferentemente en la saliva, el dorso de la lengua, y las placas supragingivales y radiculares; su concentración variará según el estado oral, incrementándose con la caries.

Los lactobacilos se usan ampliamente en la industria como fermentante y acidificante; así por ejemplo, el yogur y los quesos se obtienen de la fermentación láctica de la leche. Igualmente se encuentran en productos vegetales, carnes y vino.

## **FACTORES DE VIRULENCIA**

Son particularmente importantes en aquellos microorganismos que se relacionan más con la caries, especialmente los homofermentativos. Tiene poder acidógeno y acidúrico, inician el crecimiento a pH 5, son acidófilos y ejercen una débil pero



constante actividad proteolítica. Algunas cepas sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa, pero se adhieren muy poco a superficies lisas, por lo que deben utilizar otros mecanismos para colonizar el diente, estos son principalmente del tipo de la unión física por atrapamiento, porque quedan retenidos en superficies de retención (fosas y fisuras oclusales o cavidades cariadas) o en la malla adherente que otras bacterias constituyen cuando forman las placas dentales.

### **PODER PATÓGENO**

Se relacionan con la caries, pero tiene, en un principio, por la falta de algunos factores de cariogenicidad como su poder adhesivo, una menor significación patogénica que los estreptococos del grupo *mutans*. En cualquier caso, su cantidad en la saliva aumenta en caries activas o en sujetos predispuestos. Aun que estas bacterias tienen un papel relativo en cuanto al inicio de las lesiones, si son importantes como invasores secundarios, cuando al descender el pH a 5.4 o menos, actúan en la progresión y avance al frente de la caries (Liébana Ureña, 2002).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de los medios

Los medios caldo infusión cerebro corazón y caldo rogosa se prepararon como se indicaba en las instrucciones del fabricante y las marcas son respectivamente BDBioxon® y Oxoid®. La saliva artificial que se utilizó se preparó como sigue para 90 ml se mezclaron 20 ml de solución de carboximetilcelulosa de sodio al 4%, 10 ml de glicerina y suero salino suficiente para completar 90 ml de solución.

### Cultivo de microorganismos

1. Se cultivó un inóculo de 1 ml de *Lactobacillus acidophilus* en 20 ml de medio caldo rogosa e incubó durante 24 horas a 37° C y este es el cultivo “A”(Se dejaron pasar 12 horas antes de realizar el siguiente paso)
2. Se cultivó un inóculo de 1 ml de *Streptococcus mutans* en 20 ml de medio caldo infusión cerebro corazón e incubó durante 12 horas a 37° C y este es el cultivo “B”
3. (Este paso se efectuó una vez que fueron transcurridos 24 horas de incubación de *Lactobacillus acidophilus* y 12 horas de incubación de *Streptococcus mutans*). Se realizaron 8 cultivos a partir de los cultivos “A” y “B” tomándose los volúmenes en  $\mu\text{L}$  y mL que se indican en la tabla de abajo (en las dos columnas de en medio) de cada uno de estos dos cultivos. En la columna de la izquierda se indica el medio que se utilizó para realizar la siembra. Se incubaron 6 horas a 37°C:

Nota: Las concentraciones de microorganismos fue para *Streptococcus mutans* de  $9.01\text{e}+008$  células/mL y para *Lactobacillus acidophilus* fue de  $2.15\text{e}+008$  células/mL y se obtuvieron por medio de un espectrofotómetro empleando una densidad óptica de 600 nm y un factor de conversión de  $5.00\text{e}+008$  células/mL

### ***Técnica de TRIzol para extracción de ARN***

1. Se tomaron de cada uno de los 8 cultivos ya transcurridas las 6 horas, 1 ml de líquido de cultivo
2. Se centrifugó a 14000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
3. Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet

### **Homogenización**

4. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó el pellet de microorganismos con 1 mL de reactivo TRIzol
5. Se mezcló suavemente por pipeteo con micropipeta

### **Fase de separación**

6. Se incubó la muestra homogenizada durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas
7. Se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo, se tapó perfectamente el tubo
8. Se agitaron fuertemente durante 15 segundos
9. Se incubó por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical
10. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm (o 1200g) por 10 minutos a temperatura ambiente

Nota. Luego de centrifugar, la mezcla se separa en una fase inferior roja, fase de fenol cloroformo, en una interfase y en una fase incolora superior, lo cual contiene exclusivamente el ARN

### **Fase de precipitación**

11. Fue transferida la fase acuosa cuidadosamente a un tubo eppendorf nuevo
12. Fueron adicionados 0.5 mL de isopropanol para precipitar el ARN de la fase acuosa
13. Se incubó el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical
14. Se centrifugó a 10000 rpm (o 12000g) por 10 minutos, a temperatura ambiente

### **Fase de lavado**

15. Se removió el sobrenadante cuidadosamente y se eliminó
16. Se adicionó 1 mL de etanol al 75% al pellet para lavarlo
17. Se mezcló por agitación
18. Se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente
19. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante

### **Fase de disolución**

20. Se secó a temperatura ambiente colocando el eppendorf con el ARN sobre una toalla de papel estéril
21. Se adicionaron 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas
22. Se disolvió el ARN por pipeteo suave, se incubó durante 10 minutos a 55-60°C para lograr una completa disolución

### **Cuantificación del RNA**

23. Se obtuvo la cantidad de RNA contenida en cada una de las 8 soluciones de RNA utilizando el espectrofotómetro utilizando la opción de cuantificación de RNA

## Obtención de cDNA

1. Se preparó en un tubo eppendorf un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$  para cada una de las 8 muestras de RNA con los siguientes reactivos y cantidades. Los reactivos utilizados son del kit ImProm- II <sup>TM</sup> Reverse TranscriptionSystem de Promega®

Componentes de la reacción de retro transcripción por cada muestra de RNA		
Componente	Cantidad	Subtotal
Random Primers	2 $\mu\text{L}$	12 $\mu\text{L}$
DNTP'S	4 $\mu\text{L}$	
Buffer	4 $\mu\text{L}$	
rRNAsin	1 $\mu\text{L}$	
RT	1 $\mu\text{L}$	
RNA	0.05 $\mu\text{g}$	8 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	Completar con agua hasta alcanzar los 8 $\mu\text{L}$	
Total	20 $\mu\text{L}$	

Tabla 1. Condiciones del termociclador.

2. Se colocaron los 8 tubos Eppendorf con los componentes de la reacción en un termociclador Bio-Rad MJ Mini Personal Thermal Cycler® y se utilizó la siguiente programación:

Paso	Temperatura	Tiempo (hh:mms)
1.	25°C	00:05:00
2.	42°C	01:00:00
3.	70°C	00:10:00
4.	END	

Tabla 2. Programa de termociclador.

### Realización de RT-PCR

En la tabla se muestran las cantidades de cada componente de la reacción que se utilizó por cada pocillo empleado en las placas (En total fueron 102 pocillos empleados)

Componentes de la reacción de RT-PCR por cada pocillo	
Componente	Cantidad
Agua estéril	3 $\mu$ L
Primers y probe (excepto en GAPDH, que no tiene probe)	2 $\mu$ L (10X)
LightCycler 480 Probes Master (04 707 494 001)de Roche	10 $\mu$ L (2X)
DNA templado	5 $\mu$ L
Volumen total	20 $\mu$ L

Tabla 3. Condiciones de reacciones de PCR Tiempo real.

Tablas que muestran las características de los primers y sondas empleados para amplificar FTF (Fructosiltransferasa), GTF (Glucosiltransferasa), SpaP y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *Streptococcus mutans* UA159 Serotype C ATCC 700610

### Procedimiento

Se realizó en dos placas de 96 pocillos, a todos ellos se les agregó agua estéril y PCR Masters; empleándose en una placa 51 pocillos para el cDNA de todas las muestras de cDNA de microorganismos que fueron crecidos en medio con glucosa al 40% y en otra placa se emplearon otros 51 pocillos para las muestras de cDNA de microorganismos que fueron crecidos en medio sin glucosa. En cada placa se acomodaron de la misma forma las muestras de cDNA: se dividieron en 4 grupos siendo cada grupo para una muestra de cDNA determinada; 3 grupos de 12 pocillos para colocar el cDNA de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*(1:1),*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* (1:10),*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* (10:1) y un grupo de 16 pocillos para *Streptococcus mutans* (1).

De cada grupo de pocillos, a cada 3 pocillos se le agregaron los primers y la sonda para amplificar *ftf* (Fructosiltransferasa); a otros 3, los primers y la sonda para amplificar *gtf* (Glucosiltransferasa); a otros 3, los primers y la sonda para amplificar *SpaP*; y a otros 3, los primers para amplificar GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Se realizaron también diluciones de cDNA de *Streptococcus mutans* de 10%, 1% y 0.1%, a cada uno se le colocó en un pocillo y se les agregaron los primers para amplificar GAPDH

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Sm1	Sm1	Sm	Sm y La1:1	Sm y La1:1	Sm y La1:1	Sm y La1:10	Sm y La1:10	Sm y La1:10	Sm y La10:1	Sm y La10:1	Sm y La10:1
A	FTF												
B	GTF												
C	spaP												
D	GAPDH												
E	GAPDH												
F	GAPDH												
G	GAPDH												

Tabla 4 Colocación de las muestras y controles en el experimento

En la tabla en la que se muestra como se acomodaron los componentes de la reacción de RT-PCR en los pocillos; tanto para los microorganismos crecidos en glucosa como crecidos sin glucosa se hizo de la misma forma. Los pocillos utilizados se muestran en gris

### **Manejo del software Light Cycler® 480 versión 1.5.0 SP4 al finalizar el ciclo**

Cuadro azul “Analysis” en la parte izquierda del programa; en la barra “Analysis” se seleccionó “Overview”; en “Create New Analysis” se seleccionó “AbsQuant/2nd Derivative Max” y se analizaron todas las muestras con esto; se seleccionó la opción “High Sensitivity” y después “Calculate”, con esto se obtuvieron los valores de “Crossing point” o “Cp” y se procedió a realizar los cálculos.

### **Cálculos efectuados para cada gen analizado con una muestra de cDNA determinada**

Valor de Cp de una sola dilución de cDNA con primers para GAPDH - Valor de Cp promedio de una muestra de cDNA determinada con primers y sonda para un gen determinado = x

Valor de Cp promedio de una muestra cualquiera de cDNA con primers para GAPDH - Valor de Cp promedio de una muestra de Cdna con primers y sonda para un gen determinado = y

Valor final =  $y/x$



## 7. RESULTADOS

Se observó un incremento en la expresión de genes especialmente en el gen *SpaP* con y sin glucosa y con Sm:La en proporción 1:10. Con respecto a la cuantificación de expresión de genes, 3 diferentes muestras de cDNA de *S. mutans* y *L. acidophilus* (*Sm : La*) proporción (1:0/*Sm* puro) fueron diluidas 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> y se amplificaron los genes. Los resultados fueron representativos con la dilución 10<sup>-1</sup>, se muestran en la tabla 2. Estos resultados muestran que en cultivo puro (*Sm*) el nivel de expresión de *gtf* de *S. mutans* fue aproximadamente el mismo que el gen constitutivo GAPDH. El gen *ftf* redujo su expresión al igual que *SpaP*. Cuando *S. mutans* fue cultivado en condiciones en diferentes proporciones (1:1, 1:10 y 10:1) todos los genes fueron sobreexpresados.

*S. mutans* redujo sus genes de adherencia, principalmente *ftf* en la presencia de 40% de glucosa, sin embargo su comportamiento fue diferente en la presencia de *L. acidophilus* desde que la expresión fue 11.84 veces menor que cuando *L. acidophilus* y glucosa estuvieron presentes. Algo similar ocurrió con *gtf*, cuando aumentó la cantidad de glucosa y de *L. acidophilus* también se incrementó la expresión del gen *SpaP*. Este es un gen que codifica para la adherencia, y que también puede ser sobreexpresado en la presencia de glucosa y cuando *L. acidophilus* está presente en el ambiente. Además se probaron iniciadores específicos con cultivos puros de *S. mutans*. Estos resultados de la amplificación de *ftf*, *gtf*, *SpaP* y GAPDH se muestran en la figura 1. En el ciclo 23 sin glucosa *gtf* muestra una señal positiva, mientras que en el ciclo 42 con glucosa, *gtf* reduce su señal positiva. La señal positiva para los iniciadores de *ftf* no se expresa hasta el ciclo 33 y con la presencia de glucosa se expresa hasta el ciclo 44. Así mismo la expresión de *SpaP* comienza sin glucosa en el ciclo 34, y con glucosa en el ciclo 49. Finalmente GAPDH muestra señal positiva en el ciclo 39 sin glucosa, y en el ciclo 49 con glucosa Fig. 2.

## 8. DISCUSIÓN

Se inoculó *S. mutans* en un medio de cultivo con y sin glucosa y en otro medio con *L. acidophilus* un miembro importante de la microbiota oral. La presencia de glucosa y *L. acidophilus* incrementó la expresión de los genes estudiados, especialmente de *ftf*. Esto es considerable, desde que se ha mostrado en estudios previos que la adhesión de sacarosa, glucosa y fructosa incrementa la expresión de estos genes (Banas, 2004) (Koo, Xiao, Klein, & Jeon, 2010) Por consiguiente, cuando hay ausencia de higiene oral, el riesgo de caries se incrementa en la presencia de una dieta rica en carbohidratos.

Los genes *ftf*, *gtf* y *Spap* de *S. mutans* son importantes para crecer en una comunidad de organismos y establecerse en las superficies dentales. Estos genes codifican para la expresión de los fructanos, glucanos y adhesinas, sustancias que son consideradas como factores importantes de virulencia y que están involucrados en la formación de biopelículas. El *S. mutans* se puede adherir a la mayoría de las superficies dentales a través de la saliva. Este forma parte de la flora normal de la cavidad oral y posee la habilidad de resistir ambos, en escasos o en abundancia de azúcar en los alimentos. (Carlsson, 1983). Esta habilidad lo hace persistente en ausencia de alimentos y de lesiones cariosas convirtiéndose así en la bacteria predominante de la caries dental. También puede adaptarse fácilmente a condiciones de pH ácido y estrés oxidativo, los cuales están presente en la saliva, convirtiéndose también en la especie prevalente de la placa dentobacteriana (Banas, 2004). Este fenómeno no es una respuesta independiente de los genes, sino un evento coordinado que integra los eventos cambiantes que afectan el medio ambiente. En este estudio, hemos encontrado que el *Streptococcus mutans* en condiciones extremas de glucosa y en la presencia de *L. acidophilus* es capaz de expresar genes de adhesión y formar biopelículas.

## 9. CONCLUSIONES

- El gen *spaP* se sobreexpresó en la presencia y ausencia de glucosa.
- *S. mutans* redujo sus genes de adherencia principalmente *fifT* en la presencia de 40 % de glucosa.
- Los iniciadores específicos puros de *S. mutans* (*gtf*, *fif* y *spaP*) redujeron su señal de expresión cuando estaban acompañados de 40% de glucosa y en la proporción *Sm/ La* 1:10.
- Cuando la proporción *Sm/ La* era de 10 :1 , los genes de adherencia de *S. mutans* se sobreexpresaron.

## 10. PERSPECTIVAS

Asociar los hallazgos de laboratorio con fenómenos clínicos en niños con una dieta elevada en azúcares refinados y relacionarlo con hábitos de higiene y variedades virulentas de estreptococos.

Analizar el mismo fenómeno antes mencionado con la utilización de probióticos en la dieta de niños y su reflejo en la salud dental.

Observar modelos biológicos con dietas ricas en carbohidratos y con diferentes tipos de *Lactobacillus*.

Desarrollar modelos *in vitro* con diferentes tipos de azúcares para promover investigación clínica que justifique un cambio en el tipo y consumo de azúcares.

## 11. TABLAS

Tabla 5. Iniciadores y sondas utilizadas para identificar las cepas bacterianas.

Cepa	5'-3 secuencia	$\Delta G$	$\Delta G$	$\Delta G$	Tm	CG %	Longitud	Tamaño de producto	nMoles
		Sedimento	horquilla	heterodimero					
<b>ftf-NCBI:AE014133.2</b>									
Fwd sonda	GCCGTCATTAAC AGGGTATCAG	-4.85	0.04	-11.6	56.5	47.8	23	71	5.0
Rvs sonda	TGGCGAACGGCG ACTTA/56-	-3.61	-1.42		57.1	58.8	17		5.0
sonda	FAM/TECTGGAA C/ZEN/AGCATA ATATAA/31ABk FQ/	-3.55	-2.3	-4.38/-3.14	45.3	31.6	19		2.5
<b>gtf-NCBI:AE014133.2</b>									
PRIMER	GTTTATGATTTT GCCCTGCCTATG	-3.14	0.31	-3.9	54.6	41.7	24	63	5.0
Fwd									
sonda	ACGGTCAACCTT GCCTCGAAT	-6.76	-0.56		57	50	20		5.0
Rvs									
sonda	TGACGCTCTACA GCCTA	-4.74	-0.81	-3.55/-3.14	45.3	31	19		2.5
<b>spaP-NCBI: AE014133.2</b>									
Fwd sonda	AAGTCAGTCGGA ACGATTATCC	-3.61	0.04	-8.38	55.4	43.5	23	71	5.0
Rvs sonda	TTATTCTTATAA GTTGCGCCATCA TT/56-	-	0.31		53.3	30.8	26		5.0
sonda	FAM/CAGTGGTC G/ZEN/GACAAG 7/31ABkFQ/	-3.61	0.6	-5.19/-5.02	51.4	56.3	16		2.5
<b>GAPDH</b>									
FWD sonda	TTGGAACCTGGAA CACGTTGTG	-6.3	-0.42	-9.88	55.8	47.6	21	390	
Rvs sonda	TAAAGCTATTGG TCTTGTCCTGA A	-6.34	0.13		54.6	36	25		

Tabla 6. Niveles de expresión de *ftf*, *gtf* y *spaP* en un cultivo de *S. mutans* y glucosa al 40%

<i>Proporción de S. mutans : L. acidophilus</i>	<i>ftf</i>	<i>gtf</i>	<i>spsP</i>
<b><i>Sm</i></b>	6.12	1.63	0.4492
<b>1:1</b>	2.400	4.20	3.428
<b>1:10</b>	3.830	7.10	4.43
<b>10:1</b>	11.845	2.77	1.54

*Sm* = *S. mutans* Las unidades representan el número del producto de la PCR por ciclo comparados con el gen GAPDH.

## 12. FIGURAS

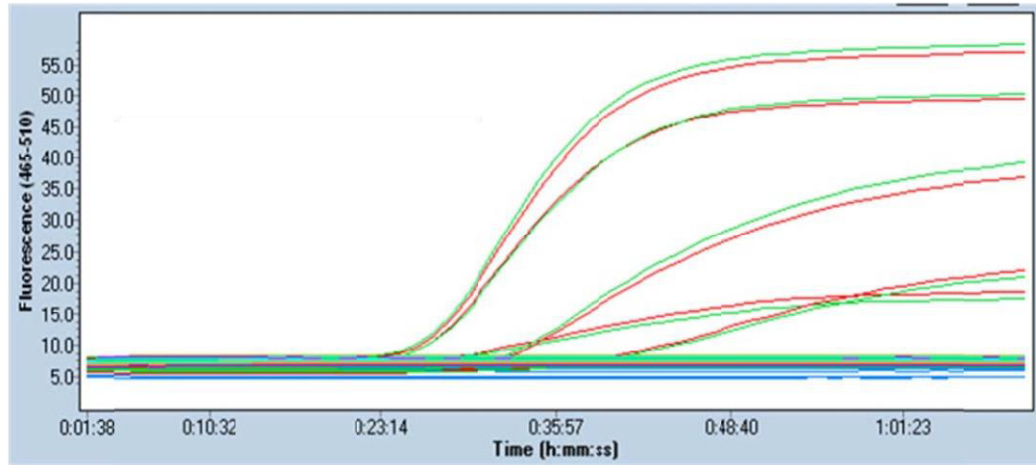


Figura 1. Expresión de genes en tiempo real RT – PCR sin glucosa.

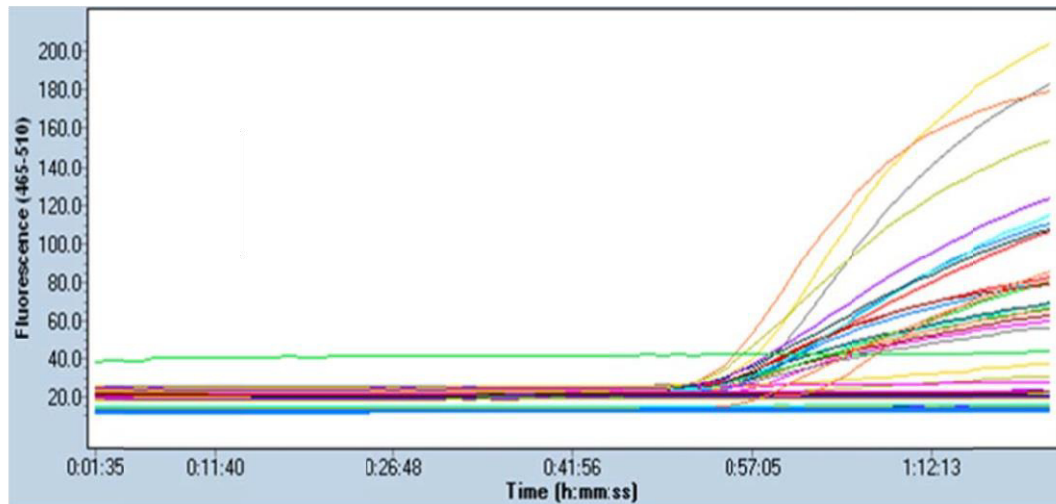


Figura 2. Expresión de genes en tiempo real RT – PCR con glucosa.

### 13. REFERENCIAS

1. Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Ferretti, J. J. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14434–14439.
2. Allukian, M. (2000). Allukian Responds. *American Journal of Public Health*, 90(12), 1951-1952.
3. Baca-Castañón, M. L., De la Garza-Ramos, M. A., Alcázar-Pizaña, A. G., Grondin, Y., Coronado-Mendoza, A., Sánchez-Najera, R. I., Escamilla-García, E. (2015). Antimicrobial Effect of *Lactobacillus reuteri* on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(1), 1–8.
4. Banas, J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1267–1277.
5. Byun, R., Nadkarni, M. A., Chhour, K.-L., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2004). Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3128–3136.
6. Chong, P., Drake, L., & Biswas, I. (2008). LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 76(7), 3093–3099.
7. Decker, E.-M., Klein, C., Schwindt, D., & von Ohle, C. (2014). Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *International Journal of Oral Science*, 6(4), 195–204.



- 8.Hamada, S., & Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44(2), 331–384.
- 9.Haukioja, A. (2010). Probiotics and Oral Health. *European Journal of Dentistry*, 4(3), 348–355.
- 10.Klein, M. I., Duarte, S., Xiao, J., Mitra, S., Foster, T. H., & Koo, H. (2009). Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 837–841.
- 11.Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I., & Jeon, J. G. (2010). Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 3024–3032.
- 12.Liebana Ureña (2002) *Microbiología Oral*. McGraw hill Interamericana . 2<sup>a</sup> Edición. (325–335, 349–351)
- 13.Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 11), 3247–3255.
- 14.Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 2), 279–294.
- 15.Martin, F. E., Nadkarni, M. A., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1698–1704.

16. Mattos-Graner, R. O., Li, Y., Caufield, P. W., Duncan, M., & Smith, D. J. (2001). Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6), 2313–2316.
17. Napimoga, M. H., Kamiya, R. U., Rosa, R. T., Rosa, E. A. R., Höfling, J. F., Mattos Graner, R. O., Mattos-Graner, R. de O. (2004). Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *Journal of Medical Microbiology*, 53(Pt 7), 697–703.
18. OMS | La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. (n.d.). Retrieved July 10, 2014,
19. Ono, T., Hirota, K., Nemoto, K., Fernandez, E. J., Ota, F., & Fukui, K. (1994a). Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of spaP gene. *Journal of Medical Microbiology*, 41(4), 231–235.
20. Paes Leme, A. F., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G., & Cury, J. A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *Journal of Dental Research*, 85(10), 878–887.
21. Rooj, A. K., Kimura, Y., & Buddington, R. K. (2010). Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. *BMC Microbiology*, 10, 16.

22. Rudney, J. D., Jagtap, P. D., Reilly, C. S., Chen, R., Markowski, T. W., Higgins, L. Griffin, T. J. (2015). Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. *Microbiome*, 3(1), 69.
23. Shemesh, M., Tam, A., Feldman, M., & Steinberg, D. (2006). Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydrate Research*, 341(12), 2090–2097.
24. Smith, E. G., & Spatafora, G. A. (2012). Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *Journal of Dental Research*, 91(2), 133–141.
25. Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303.
26. Wen, Z. T., Yates, D., Ahn, S.-J., & Burne, R. A. (2010). Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiology*, 10(1), 111.

## **ANEXO**

### **Artículo**

## Full Length Research Paper

## Expression of adherence genes of *Streptococcus mutans* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and glucose

Karina Gomez-Garcia<sup>1</sup>, Luis J. Galan-Wong<sup>1</sup>, Katiushka Arevalo-Niño<sup>1</sup>, Andrea Guadalupe Alcazar-Pizaña<sup>2</sup>, Jaime de Jesus Covarrubias-Martinez<sup>1</sup> and Myriam Angelica De La Garza-Ramos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biologicas, Instituto de Biotecnologia, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico.

<sup>2</sup>Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico.

Received 2 October, 2014; Accepted 26 January, 2015

*Streptococcus mutans* is the bacteria most frequently associated with dental caries. One of its virulence factors is its ability to form biofilm. *gtf*, *ftf* and *spaP* are genes of *S. mutans* that are involved in adhesion and colonization of teeth surfaces and therefore biofilm formation. Exopolysaccharides are catalyzed by a group of bacterial enzymes termed glycosyltransferases (GTF) and fructosyltransferases (FTF), encoded by the genes *gtf* and *ftf*, respectively, which under certain conditions can be strongly associated with cell surfaces. *Lactobacillus acidophilus* is one of the pathogens associated with *S. mutans*. We carried out research to determine whether the presence of glucose and *L. acidophilus* promote adhesion mechanisms that increase the expression of *gtf*, *ftf* and *spaP* of *S. mutans*.

**Key words:** Exopolysaccharides, dental caries, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, glucose, *gtf*, *ftf*, *spaP*.

### INTRODUCTION

*Streptococcus mutans* is strongly associated with the onset and progression of dental caries, one of the most frequent public health problems in the world that can compromise overall health through the years (Allukian, 2000). *Streptococcus mutans* is considered the main etiological agent responsible for dental caries. It is a Gram-positive, acidogenic microorganism that ferments glucose, lactose, raffinose and mannitol; it is non mobile, catalase-positive and can metabolize sucrose (Hamada and Slade, 1980).

One of the virulence factors of *S. mutans* is its ability to

form biofilm. Biofilm formation consists of three steps: 1) surface adhesion of microorganisms, 2) the formation of highly structured clusters (microcolonies), and 3) the development and stabilization of microcolonies. This process is carried out in response to environmental, physical or chemical signals that regulate certain physiological processes that depend on bacterial density (quorum sensing) and regulate the expression of genes involved in biofilm formation. Adhesion is mediated by exopolysaccharides (glucans and fructans) that are produced by the bacteria that grow in the presence of

\*Corresponding author. E-mail: myriam.garzarm@uanl.edu.mx. Tel: +52 (81) 83 29 40 00. Ext: 1781. Fax: +52 (81) 83 29 40 00 Ext 1781.

sucrose and are considered virulence factors (Paes Leme et al., 2006).

Exopolysaccharide synthesis is catalyzed by a group of bacterial enzymes termed glycosyltransferases (GTF) and fructosyltransferases (FTF), encoded by the genes *gtf* and *ftf*, respectively, which under certain conditions can be strongly associated with cell surfaces and which apparently mediate glucan induced agglutination (Li and Burne, 2001).

*S. mutans* produces a surface antigen protein of the Ag I/II family. One of these is SpaP encoded by the *spaP* gene, which contributes to initial adherence and development of the microbial community, since it can interact with a large number of substrates (Ono et al., 1994).

*Lactobacillus acidophilus* is one of the pathogens associated with *S. mutans*, which is part of the diverse microorganisms termed non-cariogenic mutans (Marsh, 2003). *Lactobacilli* can produce organic acids that decalcify the dentinal matrix and have been found in both superficial and deep caries (Byun et al., 2004). *Lactobacilli* represent approximately 1% of the culturable oral flora. Some studies have associated their presence with oral health (Haukioja, 2010). In a study by Martin et al. (2002), *Lactobacillus* sp. were found to be a numerically dominant species in human carious dentine. However, the presence of *Lactobacilli* delays the expression of adherence genes and the accumulation of glucose (Rooj et al., 2010). They possibly contend with *S. mutans* for the substrate and reduce the risk of caries (Baca-Castañón, 2014).

The total number of bacteria and the composition of the oral flora associated with cavities can give indications of the individual risk and incidence of the disease. The bacteria involved in the initiation and development of dental caries are mainly *Streptococci*, *Lactobacilli* and *Actinomyces* (Marsh, 2003). However, environmental factors such as the presence of sugar and non-mutans carbohydrate fermenting bacteria that promote a pH homeostasis that demineralizes enamel can change the biochemical composition of the biofilm or plaque (Takahashi and Nyvad, 2011). In these conditions, *S. mutans* is able to grow by increasing their adhesion factors due to their metabolic ability to decompose carbohydrate from the diet, from which they produce a large amount of organic acids (acidogenesis), and by its ability to withstand environmental stress, specifically a low pH (aciduricity) (Lemos and Burne, 2008).

The aim of this study is to assess if *Lactobacilli* can positively or negatively influence the virulence of bacteria; therefore, the objective of this research is to determine whether the presence of glucose and *L. acidophilus* promote adhesion mechanisms that increase the expression of *gtf*, *ftf* and *spaP* of *S. mutans*.

## MATERIALS AND METHODS

The gene expression of *gtf*, *ftf* and *spaP* in *S. mutans* was studied.

*S. mutans* strain AU159 (ATCC 700610) and *L. acidophilus* strain LA3 (Lyofast LA3) were lyophilized and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The lyophilized strains were activated in the medium appropriate for each bacterial culture: brain-heart infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) was used for *S. mutans* and Rogosa broth (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) for *L. acidophilus*.

Culture tubes were inoculated with 50 mL of BHI broth for *S. mutans* and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 12 h. *L. acidophilus* (50 mL) was inoculated in Rogosa broth and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Subsequently, tubes containing 20 mL of BHI alone and BHI supplemented with 40% glucose (BHIG) were inoculated with a *S. mutans* : *L. acidophilus* culture ratio of 1:1, 1:10 and 10:1. These cultures were then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . The exponential phase of *S. mutans* is 12 h and *L. acidophilus* 6 h. *S. mutans* was placed in a brain heart infusion with glucose. *Lactobacillus* was placed at 6 h in MRS (OD 600 nm, 0.5) in the same tube with *S. mutans* at 12 h. After six hours, the experiment was stopped to extract RNA. Both species fermented glucose, but *Lactobacillus* increased acidification. We wanted to observe the effect of *Lactobacillus* on *S. mutans* since *L. acidophilus* is not currently considered cariogenic but probiotic. This can be promoted together with other *Lactobacilli* as a controller of caries. *S. mutans* fermented the sugar and *L. acidophilus* had strong resistance to acid pH. This can be protective since it regulates the metabolism of other cells. A resulting biomass of 3 mL was taken from each culture and washed twice with Tris-HCl Buffer (10 mM, pH 8.0); lysozyme 500  $\mu\text{L}$  (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) was added and the mixture incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h. Total RNA extraction was carried out using TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was read at 260 nm in a SmartSpec Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). cDNA was generated using the Improm II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI). The pellet that resulted from the extraction process was resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of DEPC water and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

In order to confirm the identity of bacterium strains, primers based on the rRNA 16S of *S. mutans* and *L. acidophilus* were designed using specific sequences reported in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Oligonucleotides were designed based on DNA gene sequences in GenBank (Table 1).

Quantitative PCR was performed in a LightCycler 480 (Roche) using the Light Cycler 480 Control Kit (Roche), according to the manufacturer's recommendations. Gene amplification was done in a final volume of 50  $\mu\text{L}$ , as follows: one denaturalization cycle at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min with a ramp rate of  $4^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ; 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s with a  $4^{\circ}\text{C}/\text{s}$  ramp rate;  $55^{\circ}\text{C}$  for 15 s with a  $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$  ramp rate;  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 s with a  $4^{\circ}\text{C}/\text{s}$  quantification analysis ramp rate; finally, 1 freezing cycle at  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 s with a  $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$  ramp rate.

## RESULTS

An increase in gene expression was observed, especially with *spaP* with and without glucose and with a *Sm* : *La* ratio of 1:10. In order to quantify gene expression, cDNA samples from three different *S. mutans* and *L. acidophilus* (*Sm* : *Lm*) ratios (1:0/*Sm* alone) were diluted 10-1, 10-2 and 10-3 and gene amplification was run. Representative results obtained with the 10-1 dilution are shown in Table 2. These results show that in pure culture (*Sm*), the level of gene expression of *Sm gtf* was approximately the same as that of GAPDH. The gene *Sm ftf* is downregulated as well as *spaP*. When *S. mutans* was cultured with *L. acidophilus* in different ratio

**Table 1.** Primers and probes used to identify bacteria strains.

Strand	5'-3 Sequence	$\Delta G$ Selfdimer	$\Delta G$ hairpin	$\Delta G$ heterodimer	Tm	CG %	Length	Prod size	nMoles
<b><i>ftf</i> – NCBI: AE014133.2</b>									
Fwd Primer	GCCGTCATTAACAGGGTATCAG A	-4.85	0.04	-11.16	56.5	47.8	23		5.0
Rvs Primer	TGGCGAACGGCGACTTA /56-	-3.61	-1.42		57.1	58.8	17	71	5.0
Probe	FAM/TACTGGAAC/ZEN/AGCATA ATAA/31ABkFQ/	-3.55	-2.3	-4.38/-3.14	45.3	31.6	19		2.5
<b><i>gtf</i> – NCBI: AE014133.2</b>									
Primer	GTTTATGATTTTGCCCTGCCTAT G	-3.14	0.31		54.6	41.7	24		5.0
Primer	ACGGTCAACCTTGCTCGAAT Rvs	-6.76	-0.56	-3.9	57	50	20	63	5.0
Probe	TGACGCTCTACAGCCTA	-4.74	-0.81	-3.55/-3.14	45.3	31.	19		2.5
<b><i>spaP</i> – NCBI: AE014133.2</b>									
Fwd Primer	AAGTCAGTGGCAACGATTTATCC	-3.61	0.04		55.4	43.5	23		5.0
Rvs Primer	TTATTCTTATAAGTTGCGCCATC ATT	-10.48	0.31	-8.38	53.3	30.8	26	71	5.0
Probe	FAM/CAGTGGTCG/ZEN/GACAAG T/31ABkFQ/	-3.61	0.6	-5.19/-5.02	51.4	56.3	16		2.5
<b>GAPDH</b>									
Fwd Primer	TTGGAACGGAACACGTTGTG	-6.3	-0.42		55.8	47.6	21		
Rvs Primer	TAAAGCTATTGGTCTTGTTCCTG AA	-6.34	0.13	-9.88	54.6	36	25	390	

**Table 2.** Expression levels of *ftf*, *gtf*, and *spaP* in *S. Mutans* culture with glucose.

<i>S. mutans</i> : <i>L. acidophilus</i> ratio	<i>ftf</i>	<i>gtf</i>	<i>spaP</i>
<i>Sm</i>	6.12	1.63	0.4492
1:1	2.400	4.20	3.428
1:10	3.830	7.10	4.43
10:1	11.84	2.77	1.54

*Sm* = *S. mutans*; Units represent the number of PCR product per cycle as compared to the housekeeping gene.

conditions (1:1, 1:10 and 10:1), all genes were upregulated.

*S. mutans* suppressed adherence gene expression, mainly *ftf* in the presence of 40% glucose; however, its behavior was different in the presence of *L. acidophilus* since expression was 11.84 times less than when *L. acidophilus* and glucose were present. Something similar occurred with *gtf* since glucose and a greater number of *L. acidophilus* increased *spaP* even more. *spaP* is a gene that codifies for adherence, which can also be suppressed

in the presence of glucose and when *L. acidophilus* is present in the environment.

Primer specificity was also tested with pure cultures of *S. mutans*. The results of amplification of *ftf*, *gtf*, *spsP* and GAPDH in different repetitions are shown in Figure 1. In cycle 23 without glucose, *gtf* shows a positive signal, while in cycle 42 with glucose, *gtf* reduces its positive signal. The positive signal begins for the *ftf* initiators without glucose starting expression at cycle 33, and in the presence of glucose at cycle 44. Later, *SpaP* expression starts at cycle 34, and with glucose at cycle 49. Finally, GAPDH showed a positive signal in cycle 39 without glucose and at cycle 49 with glucose Figure 2.

## DISCUSSION

In this study, *S. mutans* was grown in a culture medium with and without glucose. In addition, *S. mutans* was grown with *Lactobacillus acidophilus*, an important member of the oral microbiota. The presence of glucose and *L. acidophilus* increased expression of the genes studied, especially *ftf*. This is noteworthy since it has

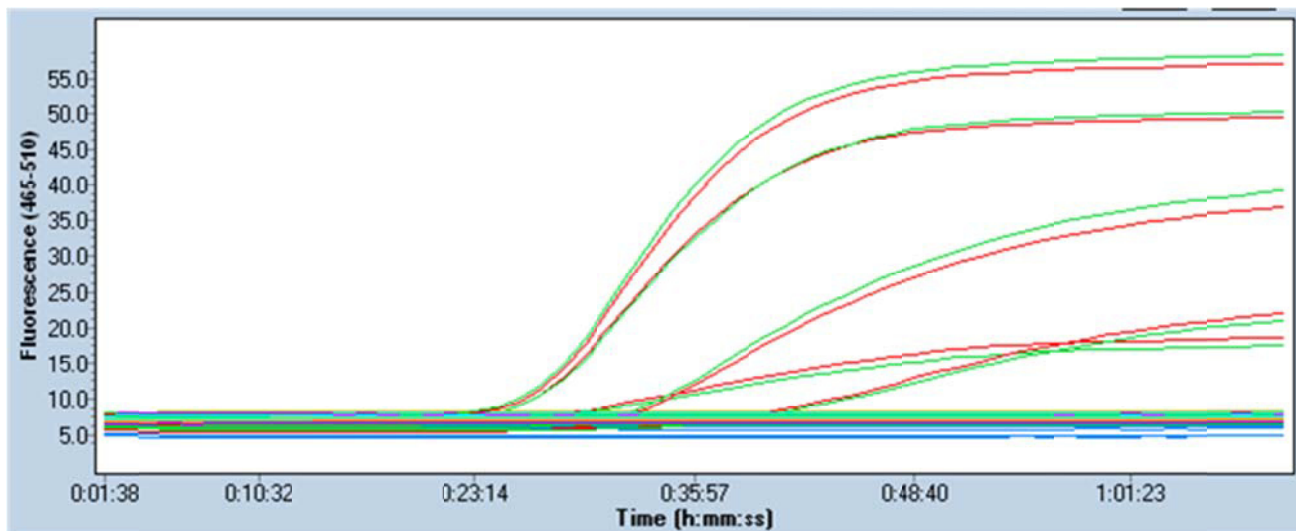


Figure 1. Gene expression by real time RT-PCR without glucose.

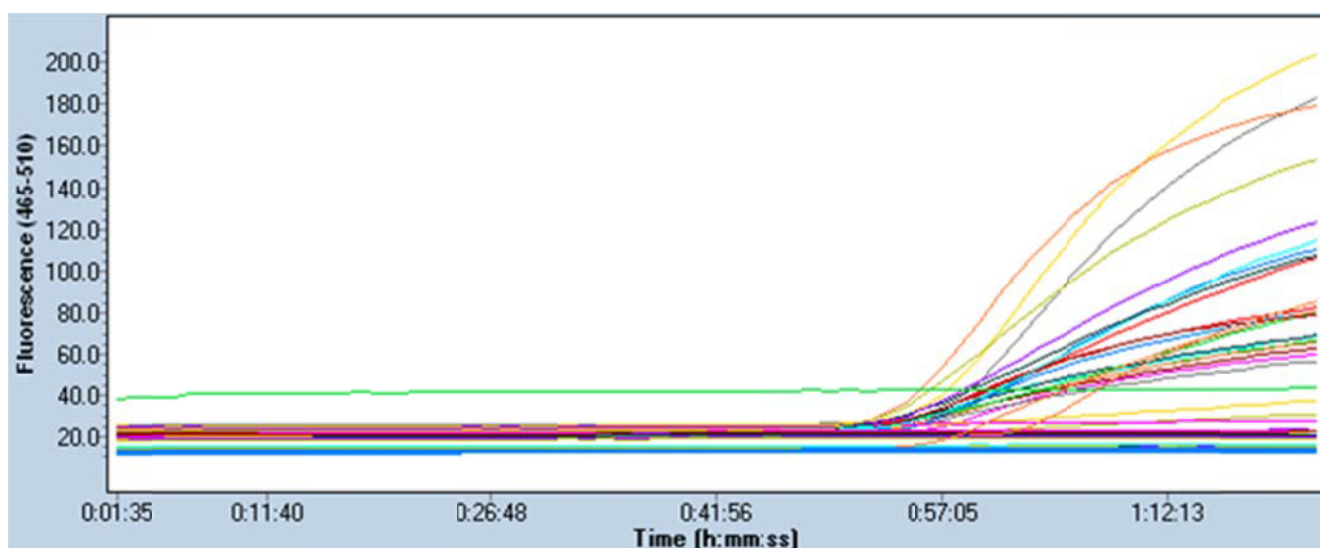


Figure 2. Gene expression by real time RT-PCR with glucose.

been shown in previous studies that the addition of sucrose, glucose or fructose increases expression of these genes (Banas, 2004; Koo et al., 2010). Thus, when there is a lack of oral hygiene, the risk of caries increases in the presence of a diet rich in carbohydrates.

*fff*, *gtf* and *spaP* are important for *S. mutans* to grow in a community of organisms and establish on the tooth surface. These genes encode the expression of fructans, glucans and adhesins, substances that are considered important virulence factors and that are involved in the development of biofilm. *S. mutans* can adhere to moist teeth surfaces through saliva. It is part of the normal flora of the oral cavity and has the ability to withstand both an

abundance and shortage of sugars in food (Carlsson, 1983). This ability makes it persist in an absence of food and in carious lesions, thus making it the predominant bacteria in dental caries. Also, it can easily adapt to conditions of acid pH and oxidative stress, which are present in saliva, making it also the prevalent species in plaque (Banas, 2004). This phenomenon is not an independent response of the genes but a coordinated event that integrates the changing events that affect the environment. In this study, we have found that *S. mutans* in extreme conditions of glucose and in the presence of *L. acidophilus* is capable of expressing adhesion genes and forming biofilms.



Stephenson and Hoch in 2002 suggested the use of bacterial two-component signal transduction systems (TCSTS) as a good antimicrobial design strategy since it is capable of engaging phosphotransferase events between histidine residues and aspartate transmembrane kinases that are responsible for transcription regulation by binding to DNA and suppressing and/or expressing it (Smith and Spatafora, 2012). Some suggest that cross-regulation between certain histidine kinases can regulate plaque formation (Chong et al., 2008).

Our findings are similar to Shemesh et al. (2006) and Decker et al. (2014) who studied the effect of different carbohydrates. In addition to this, they investigated the expression of glucosyltransferases and other biofilm-associated genes and found that the combined presence of carbohydrates stimulate the upregulation of glucan- and biofilm-associated genes in a different way than glucose alone. Shemesh et al. (2006) also found that gene expression was dependent on the growth phase.

We did not use biofilms in our study since our objective was to determine whether the presence of glucose and *L. acidophilus* promote adhesion mechanisms that increase the expression of *gtf*, *fff*, and *spaP*. However, bacteria were harvested during their exponential phase to investigate gene expression.

Dietary carbohydrates and *L. acidophilus* are important environmental factors in the development of biofilms that can cause oral infections.

## Conflict of interests

The authors did not declare any conflict of interest.

## REFERENCES

- Allukian M Jr (2000). The neglected epidemic and the surgeon general's report: a call to action for better oral health. *Am. J. Public Health* 90(6):843-845.
- Baca-Castañón ML, De la Garza-Ramos MA, Alcázar-Pizaña AG, Grondin Y, Coronado-Mendoza A, Sánchez-Najera RI, Cárdenas-Estrada E, Medina-De la Garza CE, Escamilla-García E (2014). Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases Actinomyces naeslundii and Tannerella forsythia. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. Nov 25 [Epub ahead of print]
- Banas JA (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front. Biosci.* 9:1267-1277.
- Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. (2004) Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J. Clin. Microbiol.* 42(7):3128-3136.
- Carlsson J (1983). Regulation of sugar metabolism in relation to feast-and-famine existence of plaque, p. 205-211. In B. Guggenheim (ed.), *Cariology today*. Karger, Basel, Switzerland. pp. 205-211.
- Chong P, Drake L, Biswas I (2008). LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 76: 3093-3099.
- Decker EM, Klein C, Schwindt D, von Ohle C (2014). Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int. J. Oral Sci.* 6(4):195-204.
- Hamada S, Slade HD (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44(2):331-84.
- Haukioja A (2010). Probiotics and oral health. *Eur. J. Dent.* 4: 348-355.
- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG (2010). Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J. Bacteriol.* 192(12):3024-3032.
- Lemos JA, Burne RA (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 154 (Pt 11):3247-3255.
- Li Y, Burne RA (2001). Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology* 147(Pt 10):2841-2848.
- Marsh PD (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149 (Pt 2): 279-294.
- Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J. Clin. Microbiol.* 40(5):1698-704.
- Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F, Fukui K (1994). Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of *spaP* gene. *J. Med. Microbiol.* 41(4):231-235.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J. Dent. Res.* 85(10):878-87.
- Rooj AK, Kimura Y, Buddington RK (2010). Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 10:16.
- Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D (2006). Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydr. Res.* 341(12):2090-2097.
- Smith EG, Spatafora GA (2012). Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J. Dent. Res.* 91(2):133-141.
- Stephenson K, Hoch JA (2002). Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2(5):507-512.
- Takahashi N, Nyvad B (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J. Dent. Res.* 90:294-303.