



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DAÑO ULTRAESTRUCTURAL A *Streptococcus mutans*
PRODUCIDO POR HISTATINAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

YAMILI MÁRQUEZ TORRES

TUTORA: Dra. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ultraestructura de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM; bajo la asesoría de la Dra. Ana María Fernández Presas.

Este trabajo fue apoyado con el fondo de PAPIIT: IN215315

DEDICATORIA

A Francisca y Efraín mis padres, por apoyarme en todo este camino de altos y bajos, por los buenos ejemplos que me dieron para poder terminar este capítulo de mi vida.

A Aarón López mi esposo, incondicional en todo momento, gracias por todo, tanto en lo que estamos por concluir y por lo que vendrá...

A Dra. Anita por los buenos consejos y sabias palabras en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha dado durante el trayecto desde que ingrese a ella.

Especialmente a la Dra. Ana María Fernández Presas que no solo confió en mi para este gran proyecto también me regalo su conocimiento y me transmitió el amor por la investigación, me dio su tiempo, su apoyo, sus oraciones, enseñanzas de fé y su gran cariño que sabe que es mutuo...

A un gran equipo de trabajo con el que se realizó este proyecto, amigos y profesores.

A la Q.F.B Angélica Reyes Torres por el apoyo técnico brindado a este proyecto de investigación y por esa bonita amistad que surgió.

Dra. Lilia Robert, al Dr. Rafael García, a José por su compañía, a Beatriz, gracias por ser mi amiga incondicional en todo momento por tu compañía en el laboratorio y en experiencias de vida.

Y especialmente dedico este trabajo a Dios que sin él, no podría haber realizado este proyecto profesional, y sé que me dará más fuerza para continuar, con el proyecto más grande que me está por venir.

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	VI
INTRODUCCIÓN	1
Caries	1
Ecología en la cavidad oral	3
Características Generales de las bacterias	4
Estructuras de las bacterias	8
Membrana citoplasmática	8
Pared celular	10
Glicocáliz	11
Género <i>Streptococcus</i>	12
<i>Streptococcus mutans</i>	14
Saliva	18
Péptidos antimicrobianos (AMPs)	22
Péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs)	23
Histatinas	24
Tipos de microscopios	25
Microscopios ópticos compuestos	26
Microscopio electrónico	26
Métodos microscópicos de observación de las bacterias	27
Examen en fresco	27
Exámenes tintoriales	28
Simples	28

Diferenciales o compuestas	29
Tinción de Gram	29
Tinción de Ziehl-Neelsen	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	30
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
MATERIAL Y MÉTODOS	33
Recolección de saliva	33
Cultivo bacteriano	33
Histatinas 5	34
Incubación de <i>Streptococcus mutans</i> más saliva total, saliva más histatinas 5 e histatinas 5	34
Determinación de las alteraciones de <i>Streptococcus mutans</i> incubados con histatinas	36
Análisis del daño en la pared celular y/o membrana plasmática de <i>Streptococcus mutans</i>	37
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
Incubación de <i>Streptococcus mutans</i> con saliva, saliva más histatinas e histatinas expresados en unidades formadoras de colonias	38
Microscopía electrónica	42
Descripción morfológica de <i>Streptococcus mutans</i>	42
<i>Streptococcus mutans</i> incubados con saliva	44

Streptococcus mutans incubados con saliva más histatinas	46
<i>Streptococcus mutans</i> incubados con histatina 5	48
Análisis estadístico	50
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS	59
APÉNDICE	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática de algunos de los factores que participan en el desarrollo de la caries dental	2
Figura 2. Proporciones de microorganismos en la base de datos del Microbioma Oral Humano (HOMD)	4
Figura 3. Bacterias Grampositivas y Gramnegativas	6
Figura 4. Representación esquemática de la estructura general de las bacterias	8
Figura 5. A: Membrana citoplasmática (bacterias grampositivas y gramnegativas). B: Pared celular de las bacterias grampositivas	11
Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los Estreptococos	13
Figura 7. Representación en forma de dibujo de algunos factores de Cariogenicidad de <i>Streptococcus mutans</i>	15
Figura 8. Presentación esquemática de las funciones principales de la saliva	21
Figura 9. Microscopio óptico compuesto de fondo claro	25

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Principales características de los procariontas	6
Tabla 2. Algunos caracteres fenotípicos usados para clasificar las bacterias	7
Tabla 3. Tipos de microscopios	26

LISTA DE FIGURAS EN LOS RESULTADOS

Figura 1. <i>Streptococcus mutans</i> incubados con: A) saliva, B) Amortiguador salino tamponada pH7.0, C) saliva más histatinas, D) Amortiguador salino tamponada pH 7.0, E) histatina 5 y F) Amortiguador salino tamponada pH 7.0	41
Figura 2. Morfología de <i>Streptococcus mutans</i> . A y B incubados con amortiguador salino de fosfatos durante 24 horas	43
Figura 3. Micrografías electrónicas de <i>Streptococcus mutans</i> incubados durante 24 hrs. a 37°C con PBS o con saliva	45
Figura 4. Micrografías de estreptococos incubados por 24 hrs. con Saliva e histatinas o PBS	47
Figura 5. Micrografías electrónicas de <i>Streptococcus mutans</i> incubados con histatinas o PBS	49
Grafico 1. <i>Streptococcus mutans</i> incubados con saliva y con PBS durante 24 hrs. a 37°C	38
Grafico 2. <i>Streptococcus mutans</i> incubados con saliva e histatinas y con PBS durante 24 hrs a 37°C	39
Grafico 3. <i>Streptococcus mutans</i> incubados con histatina 5 y con	

PBS durante 24 hrs	40
Gráfico 4. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de <i>Streptococcus mutans</i> tratadas con saliva	46
Gráfico 5. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de <i>Streptococcus mutans</i> tratadas con saliva e histatinas	48
Gráfico 6. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de <i>Streptococcus mutans</i> tratadas con histatina 5	50
Tabla 1. Análisis estadístico de las alteraciones de las membranas	51

RESUMEN

Se han realizado estudios orientados a estudiar la susceptibilidad de *Streptococcus mutans* expuesto a péptidos antimicrobianos contenidos en la saliva, sin embargo, aún no ha sido estudiado el efecto de éstos en la morfología de la bacteria. El objetivo de este estudio fue estudiar las alteraciones ultraestructurales en *Streptococcus mutans* inducido por histatina 5 y por la saliva. Se utilizó la cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans* en todos los experimentos. Se recolectó saliva estimulando su producción, masticando parafilm, de donadores sanos.

La histatina 5 se obtuvo de Sigma-Aldrich. Las colonias de estreptococos incubadas con saliva e histatina 5 fueron identificadas morfológicamente y cuantificadas, los resultados se expresan como (UFC) ml⁻¹. Los resultados obtenidos después de la incubación de *Streptococcus mutans* con saliva, saliva e histatinas e histatinas, mostraron cuentas bacterianas significativamente disminuidas después de la incubación con saliva, saliva e histatinas e histatinas ($P \leq 0.0001$) comparadas con las bacterias incubadas únicamente en PBS (7.0).

El daño ultraestructural observado en *Streptococcus mutans* incubados con saliva, saliva e histatinas e histatinas, fue principalmente en la pared celular que mostró interrupciones en el peptidoglicano con expulsión del contenido citoplásmico. También se observó ruptura de la membrana plasmática, nucleóide picnótico y en algunas bacterias disminución en la electrodensidad del citoplasma. El análisis de los cambios ultraestructurales en la pared celular (PC) y en la membrana plasmática (MP) de *Streptococcus mutans* incubados con saliva PC ($P \leq 0.001$), MP ($P \geq 0.05$); saliva e histatinas PC ($P \leq 0.001$), MP ($P \leq 0.001$) e histatinas PC ($P \leq 0.001$), MP ($P \leq 0.001$) fueron estadísticamente significativos.

INTRODUCCIÓN

CARIES

La palabra caries proviene del latín, que significa podredumbre. En el Siglo I d.c. el médico romano Aulo Cornelio Celso la usó como término médico para indicar la corrosión o podredumbre de las partes óseas del cuerpo humano y posteriormente, en el Siglo XVII se emplea para referirse específicamente a la caries dental (<http://etimologias.dechile.net/?caries>).

La caries dental es una de las enfermedades bucodentales más frecuente que afecta entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos (Siqueira, *et al.*, 2012). Se le considera como un proceso patológico de origen infeccioso y transmisible que afecta a las estructuras dentarias y se caracteriza por un desequilibrio bioquímico; de no ser revertido a favor de los factores de resistencia, conduce a cavitación y alteraciones del complejo dentino-pulpar (Duque de Estrada *et al.*, 2006); situándola como principal causa de pérdida de dientes y dolor en la cavidad oral. Además, dicha enfermedad tiene una asociación con enfermedades sistémicas, por ejemplo: en pacientes con problemas cardíacos puede causar efectos secundarios severos y en niños puede aumentar el riesgo de endocarditis (Cuadrado *et al.* 2013; Ajami *et al.*, 2015).

Los factores de riesgo son eventos o fenómenos de cualquier naturaleza a los cuales se expone el individuo en su ambiente, cuya consecuencia puede ser la producción de una enfermedad o efecto.

Hay una variedad de factores de riesgo que pueden estar presentes en todas las etapas de la vida que contribuyen al desarrollo de caries dental como son: genéticos, inmunológicos, microbianos, socioeconómicos y ambientales (Peterson *et al.* 2011; Luján *et al.*, 2007; Gispert AE *et al.*, 2000) **(Figura 1)**.

Es una enfermedad producida por bacterias, especialmente *Streptococcus mutans* y lactobacilos, que forman parte de la placa bacteriana y son capaces de producir ácido láctico y propiónico, que actúan desmineralizando y

desestructurando la superficie externa del esmalte. Por eso es importante controlar la infección producida por estos patógenos (Hernández, 2012; Pretty y Ekstrand, 2015; Tanzer, 1992; Luján *et al.*,2007; Duque de Estrada *et al.*, 2006).

En los pacientes con gran actividad de caries se debe eliminar, las cavidades, que son un ecosistema favorable para la proliferación de estos microorganismos patógenos y administrar antimicrobianos y remineralizadores que detienen la desmineralización que producen y tener una buena higiene bucal ya que es la clave para prevenir dicha enfermedad (Luján *et al.*,2007).

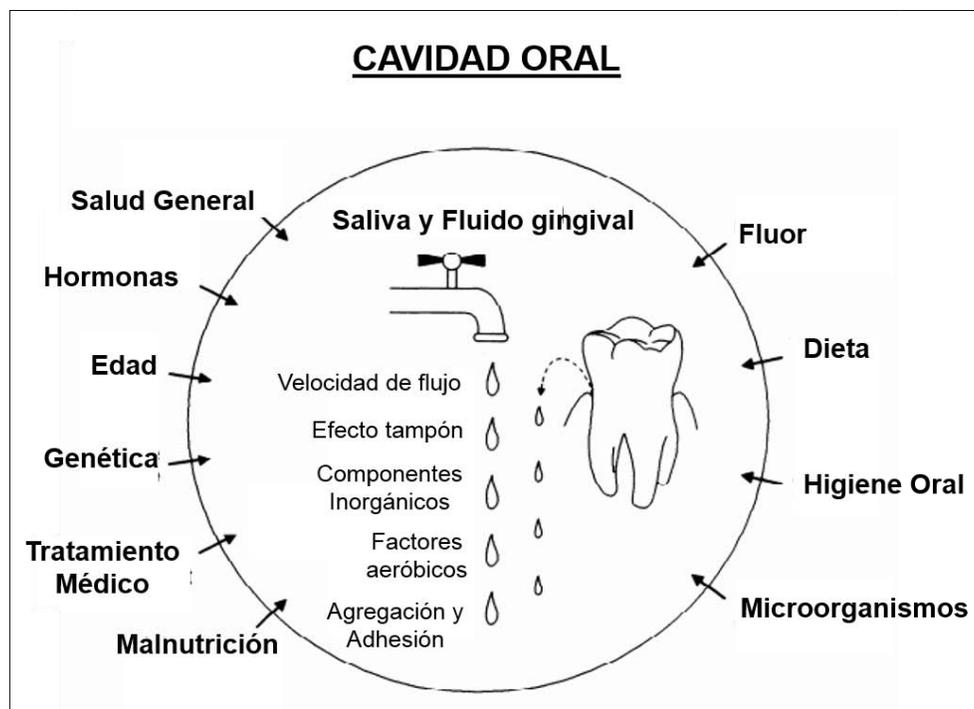


Figura 1. Ilustración esquemática de algunos de los factores que participan en el desarrollo de la caries dental. Tomado de: Lenander-Lumikari y Loimaranta, 2000.

ECOLOGÍA EN LA CAVIDAD ORAL

La cavidad oral consiste de una mucosa cubierta con un epitelio escamoso estratificado y epitelio no queratinizado, las papilas de la lengua, las estructuras de los dientes por encima del margen gingival, con superficies diferentes, surcos y huecos. Estos sitios constituyen nichos ecológicos separados que promueven el desarrollo de microorganismos y en cada sitio un microbioma distinto; lo que la hace un ecosistema extremadamente diverso, dinámico y único.

Las condiciones ambientales tales como la temperatura, salinidad, acceso a oxígeno y nutrientes, condiciones de pH, la variabilidad del flujo salival y el uso de antibióticos tienen un impacto sobre el ecosistema (Struzycka Izabela, 2014; Costalonga y Herzberg, 2014).

Una característica distintiva de la cavidad oral es la superficie del diente o esmalte. En esta superficie se apoya el crecimiento y la maduración de una biopelícula microbiana compleja o biofilm. Los nutrientes fundamentales en esta biopelícula dental son las proteínas y glicoproteínas de la saliva y los carbohidratos, las proteínas y los lípidos de la dieta alimentaria.

En la actualidad contamos con una base de datos del Microbioma Oral Humano (HOMD) de los organismos más importantes presentes en la cavidad oral, los cuales son clasificados como Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) (Costalonga y Herzberg, 2014) **(Figura 2)**.

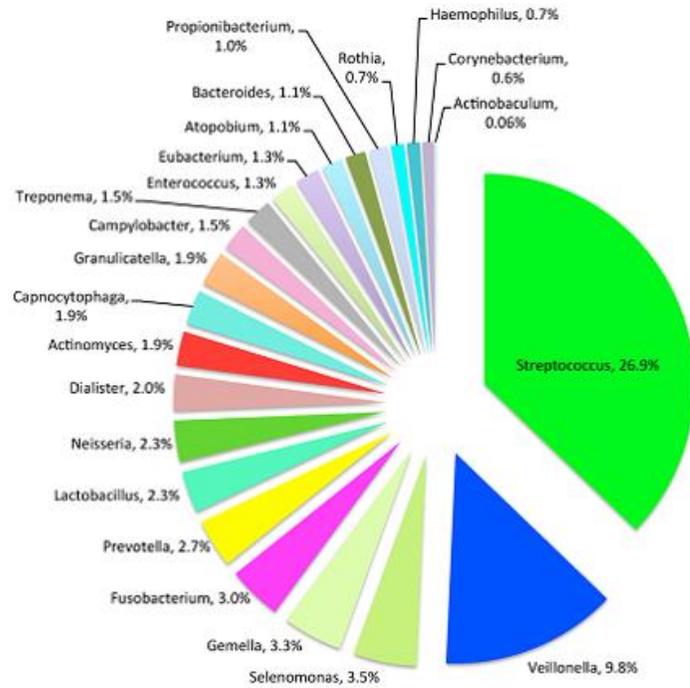


Figura 2. Proporciones de microorganismos orales en la base de datos del Microbioma Oral Humano (HOMD) Tomado de: Costalonga y Herzberg, 2014.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariontes, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano (**Figura 3**), así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan sólo en el interior de células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico. El cromosoma de una bacteria típica, como *Escherichia coli*, es una molécula única circular con dos cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN). Las bacterias emplean un ribosoma de menor tamaño, el ribosoma 70S (Murray *et al.*, 2009) (**Tabla 1**).

Para realizar su clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño (de 1 a 20µm o más), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadena o formando cúmulos); mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas.

Las bacterias que tienen forma esférica u ovoide se denominan cocos. Y si se tiñen de azul con el Gram, se les llama grampositivos. Cuando los cocos se agrupan en cadenas, se les denomina estreptococos y cuando lo hacen en racimos, se les llama estafilococos; también se pueden agrupar en pares que reciben el nombre de diplococos. Las bacterias en forma de bastón reciben el nombre de bacilos.

Si al teñirlos con el Gram captan el colorante secundario (Safranina), se les denomina gramnegativos. Los bacilos curvados que presentan espirales se llaman espirilos, rígidos; algunas bacterias en espiral presentan formas fácilmente reconocibles, como las espiroquetas, semejantes a un tornillo o sacacorchos, flexibles. Las bacterias que carecen de pared celular tienen gran plasticidad (micoplasmas) y adoptan una variedad de formas. Las bacterias esféricas tienen un tamaño promedio de 1 micrómetro de diámetro, mientras que los bacilos miden 1.5 de ancho por 6 micrómetros de largo. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.htm> l; Murray *et al.*, 2009) (**Tabla 2**).

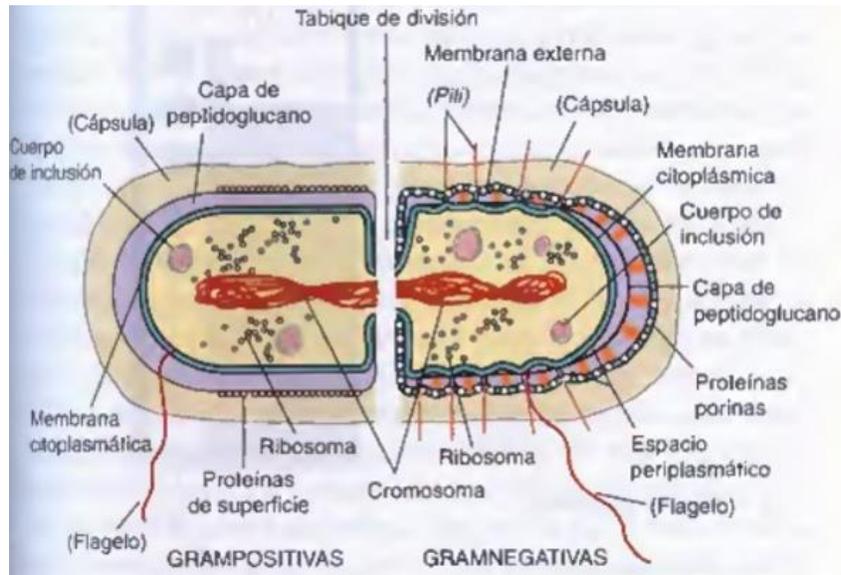


Figura 3. Bacterias Grampositivas y Gramnegativas (Murray *et al.*, 2009)

Tabla 1. Principales características de los procariontes

Características	Procariontes
Principales grupos	Bacterias
Tamaño (aproximado)	0.5-3 μm
Estructuras del núcleo	
Núcleo	Sin membrana nuclear
Cromosomas	ADN único y circular. Genoma haploide
Estructuras del citoplasma	
Mitocondrias	Ausente
Aparato de Golgi	Ausente
Retículo endoplásmico	Ausente
Ribosomas (coeficiente de sedimentación)	70S (50S + 30S)
Membrana citoplásmica	No contiene esteroides
Pared celular	Es una estructura compleja, formada por Proteínas, lípidos y peptidoglucanos
Reproducción	Asexual (fisión binaria)
Movimiento	Flagelos simples, si existen
Respiración	A través de la membrana citoplásmica

Tomado de: Murray *et al.*, 2009.

Dado su pequeño tamaño, las bacterias tienen que observarse a través de dispositivos de aumento como los microscopios ópticos compuestos. Además, en muchos casos se debe recurrir a métodos tintoriales; por ejemplo, la tinción de Gram que permite distinguir entre las bacterias grampositivas y gramnegativas o incluso, en algunas ocasiones, a tinciones especiales que incrementan sus dimensiones, como en las que se emplean sales de plata (Beveridge, 2001).

Tabla 2. Algunos caracteres fenotípicos usados para clasificar las bacterias

Caracteres	Ejemplos
Tintoriales	Grampositivas, gramnegativas, ácido-alcohol resistentes o no
Morfológicos	Cocos, bacilos, incurvadas
Movilidad	Inmóviles, móviles y situación de los flagelos
Esporos	Ausencia, presencia, situación en la célula, deformantes o no
Bioquímicos y fisiológicos	Condiciones para el crecimiento (p.ej., pH, temperatura o relación con el oxígeno), fuentes de carbono utilizadas, productos finales en la fermentación (p. ej., ácidos o gases), enzimas
Estructuras de envoltura	específicas y otros productos catabólicos finales Tipos de mureína, de ácidos teicoicos o del Lipopolisacarido
Análisis de lípidos	Tipos de ácidos grasos, características de los ácidos micólicos, fosfolípidos o glucolípidos
Perfiles proteicos	Separación electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE)
Composición química total	Secuenciación/espectrometría de masas

Tomado de: Liébana, 2002.

ESTRUCTURAS DE LAS BACTERIAS

Las bacterias presentan una serie de estructuras de cubierta o envoltura situadas superficialmente que, en las bacterias grampositivas y gramnegativas, son, de dentro afuera, la membrana citoplasmática, la pared celular y el glicocáliz. En el interior celular se encuentra el citoplasma, y en él los ribosomas, el ADN cromosómico y otros elementos. Como apéndices, las bacterias poseen flagelos, fimbrias y pili. Las bacterias no siempre tienen todas las estructuras mencionadas (**Figura 4**) (Liébana, 2002; Sánchez y Tay, 2003).

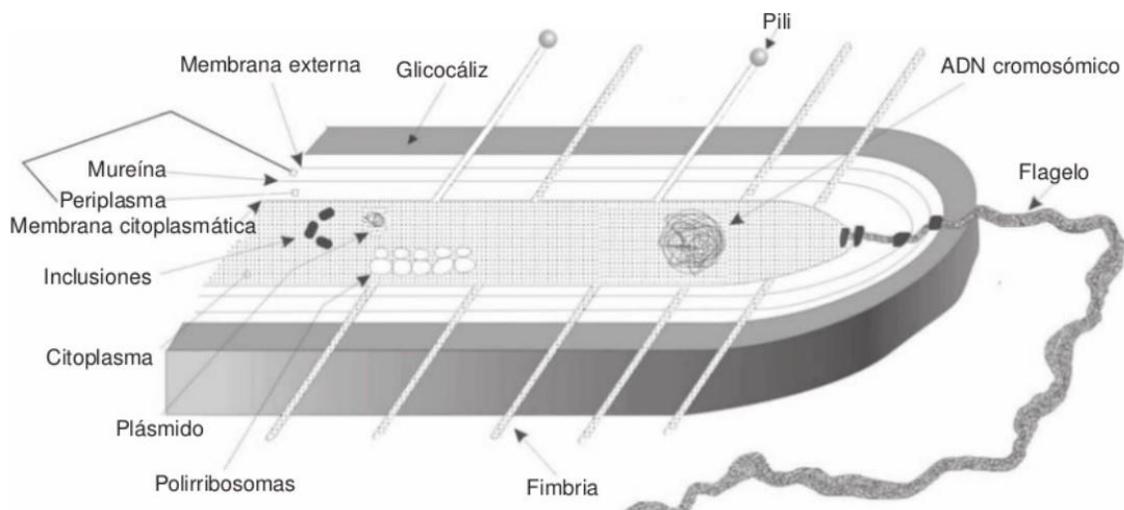


Figura 4. Representación esquemática de la estructura general de las bacterias.
Tomado de: Liébana, 2002.

1. Membrana citoplasmática.

También se le conoce como membrana plasmática. Es una estructura situada por debajo de la pared celular, delimitada hacia fuera por el periplasma en las bacterias gramnegativas y por un espacio, casi inexistente, en las grampositivas (**Figura 3, 4 y 5**).

La membrana celular cumple la función de barrera osmótica, tiene permeabilidad selectiva y permite el ingreso de nutrientes y la salida de desechos por mecanismos de transporte activo y pasivo. En ella se

encuentran los sistemas de fosforilación oxidación y el transporte de electrones para la producción de energía; además tiene las enzimas necesarias para la síntesis de lípidos, de la pared celular (por ejemplo, el bactoprenol), de la cápsula, etc. Finalmente la membrana contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio externo.

Está constituida por una bicapa lipídica y por proteínas. (García J., 1996).

- **Lípidos.** Mayoritariamente son fosfolípidos. Algunas bacterias contienen, también, glucolípidos; en las grampositivas ciertos glucolípidos anclan los ácidos lipoteicoicos a la membrana citoplásmica.
- **Proteínas.** Estructuralmente se distinguen dos tipos:
 - a) integrales o intrínsecas, incluidas en la bicapa, firmemente unidas a la misma e incluso sobrepasándola; unas confieren estabilidad al conjunto y otras intervienen en el transporte de sustancias (permeasas) o forman parte de la cadena transportadora de electrones y
 - b) periféricas, superficiales o extrínsecas; están unidas débilmente a las superficies, tanto internas como externas, y tienen relación con importantes funciones metabólicas (Liébana, 2002).

Participa en procesos vitales para las bacterias como son: **bioenergéticos**, relacionados con el transporte de electrones y fenómenos de fosforilización oxidativa; **biosintéticos**, ya que posee sistemas que intervienen en la síntesis de diversas estructuras, por ejemplo: pared celular y glicocáliz y **biodegradativos**, pues en ella radican enzimas (exoenzimas) que al ser excretadas al interior transforman compuestos complejos en otros más simples y asimilables (<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>).

Es el lugar en el que se anclan las fimbrias, los pilis y los flagelos, algunos antibióticos actúan sobre ella provocando su desorganización.

En las bacterias grampositivas a partir esta estructura, surgen unas invaginaciones, los mesosomas, que se extienden al interior del citoplasma (Liébana, 2002).

2. Pared celular

Constituye la envoltura inmediatamente más externa a la membrana plasmática.

Está compuesta por polisacáridos, proteínas y lípidos. En las bacterias grampositivas y en las gramnegativas los distintos componentes que forman la pared celular se estructuran de manera diferente. En la pared celular de las bacterias grampositivas destaca una banda ancha opaca a los electrones, integrada, principalmente, por un polímero denominado mureína o peptidoglucano que constituye el componente mayoritario de la pared celular (50-80% en peso) junto con ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos (**Figura 5**). La pared celular de las bacterias gramnegativas es multiestratificada, y destaca una membrana externa y un periplasma; en el interior de este último aparece una banda estrecha opaca a los electrones que constituye el peptidoglucano, que se encuentra únicamente del 1 al 10% de la pared celular (Valero P., 2002).

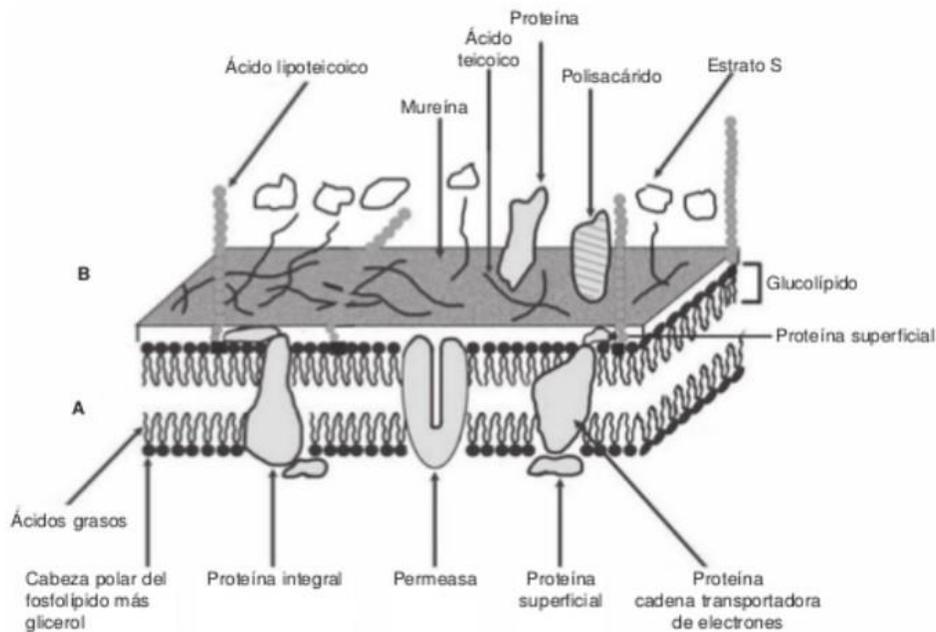


Figura 5. **A:** Membrana citoplasmática (bacterias grampositivas y gramnegativas). **B:** Pared celular de las bacterias grampositivas. (Liébana, 2002)

3. Glicocáliz

Con este nombre se suele denominar a todo polímero extracelular situado inmediatamente por fuera de la pared celular. Comprende dos estructuras facultativas de las bacterias: la cápsula y la capa mucosa (capa mucilaginosa, limo o *slime*) (Liébana, 2002).

La cápsula y la capa mucosa son hidrófilas, poseen un gran contenido de agua (hasta un 90%), tienen una consistencia viscosa o gelatinosa y rodean una o varias células (Liébana, 2002). Su diámetro es variable, le sirve de protección (evitando la fagocitosis), reservorio de alimento y también aumenta su infectividad (Sánchez y Tay, 2003).

En algunas bacterias grampositivas la matriz del glicocáliz está realmente constituida por los ácidos lipoteicoicos.

El glicocáliz está formado por un material, por lo general polisacárido, más o menos adherido a la pared celular. Esta estructura ayuda a configurar la denominada **biopelícula** bacteriana, constituida por diversos tipos de microorganismos (fundamentalmente bacterias) que

crecen juntos formando microcolonias embebidas en un material adherente, fenómeno de gran importancia en la génesis de la **placa dental** (Liébana, 2002).

GÉNERO *STREPTOCOCCUS*

El género *Streptococcus* forma parte de la familia *Streptococcaceae*, el cual comprende una gran variedad de especies; algunas forman parte de la flora normal humana y otros son causantes de enfermedades importantes en el hombre.

Se ha descrito un viraje en la población microbiana en la placa en desarrollo de preponderantes formas cocáceas en la placa temprana con un incremento de bacilos y formas filamentosas. Sin embargo, los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental (Sánchez y Tay, 2003).

Los estreptococos son cocos grampositivos que se disponen en parejas o cadenas. Son aerobios, aunque pueden desarrollarse en condiciones anaerobias. Carecen de catalasa y su tolerancia al oxígeno se debe a peroxidasas flavínicas y pseudocatalasas. Su crecimiento al aire se ve favorecido por una atmósfera del 5-10% de CO₂. Presentan un metabolismo fermentativo y producen esencialmente ácido láctico. Su temperatura óptima de desarrollo es de 36 ± 1°C. Al cultivarlos en agar sangre producen distintos tipos de hemólisis y las especies más significativas en patología humana son: *Streptococcus pyogenes*, relacionado con faringitis y con glomerulonefritis y fiebre reumática, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), causante de neumonía que se puede complicar con septicemias y meningitis; *Streptococcus agalactiae*, que produce infecciones neonatales; y un conjunto de estreptococos que son particularmente importantes en la cavidad oral como *Streptococcus mutans* (Liébana, 2002).

El hidrato de carbono que en mayor cantidad consume el hombre es la sacarosa y es el que con más facilidad y en mayor cuantía utilizan los estreptococos orales. Tanto este compuesto como otros son introducidos en la vía glucolítica hasta formar piruvato; a partir de aquí los estreptococos siguen la denominada vía de la piruvato formato liasa, formándose formato y acetil CoA y, a partir de éste, acetato y etanol y, especialmente la vía de lactato deshidrogenasa con formación de lactato, el producto final más importante. Por ello, estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa (Linossier AC. y Valenzuela CY., 2011).

Desde el punto de vista estructural y dependiendo de las especies se puede distinguir el ADN cromosómico, citoplasma, mureína o peptidoglucano, membrana citoplasmática, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, carbohidratos de la pared celular, proteínas de la pared celular, fimbrias, cápsula y capa mucosa, que ésta última es de gran importancia en la formación de placas dentales y en la ecología de la cavidad oral (Liébana, 2002).

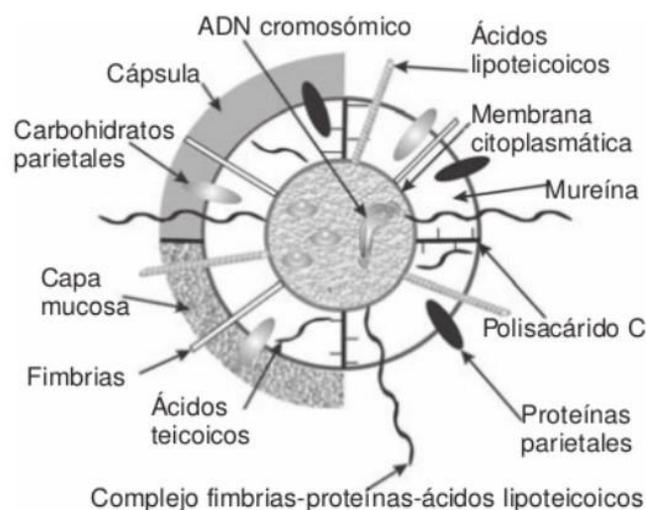


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los estreptococos. Tomado de: Liébana, 2002.

Streptococcus mutans

En 1924, J. K. Clark aisló un organismo de lesiones cariadas y lo llamó *mutans*, ya que las células eran ovaladas y pensó que eran una forma mutante de *Streptococoi*. A finales de los años 1950 *mutans* recibió una mayor atención de la comunidad científica y, a mediados de los años 1960, fue reconocida como el principal agente etiológico de la caries dental (Lemos *et al.*, 2013).

El hábitat natural de *Streptococcus mutans* es la boca humana, por su capacidad de colonizar superficies duras, específicamente en la placa dental, donde residen multiespecies de bacterias, el biofilms (biofilm o biopelícula), que se forma sobre las superficies de los dientes; con todas sus funciones, interacciones y propiedades.

En individuos con caries activa o especialmente predispuestos su cantidad aumenta significativamente. Se considera el microorganismo cariígeno por excelencia y su papel es importante en las endocarditis subagudas, representando entre el 7-14% de todas las originadas por los estreptococos (Escribano y Matesanz, 2005).

Los factores de cariogenicidad de *Streptococcus mutans* son (**Figura 7**):

- a) síntesis de polisacáridos intracelulares;
- b) síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles y fructanos;
- c) movilización de polisacáridos intracelulares por glucógeno fosforilasa y extracelulares solubles por dextranasas y fructanasas;
- d) poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, inicio de crecimiento a pH 5 y corto efecto post-pH;
- e) importante capacidad adhesiva por las proteínas parietales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, y agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos y
- f) producción de bacteriocinas con actividad sobre otras bacterias grampositivas que podrían tener una significación ecológica, aunque no

está demostrada *in vivo* su importancia como factor selectivo de la microbiota (Liébana, 2002).

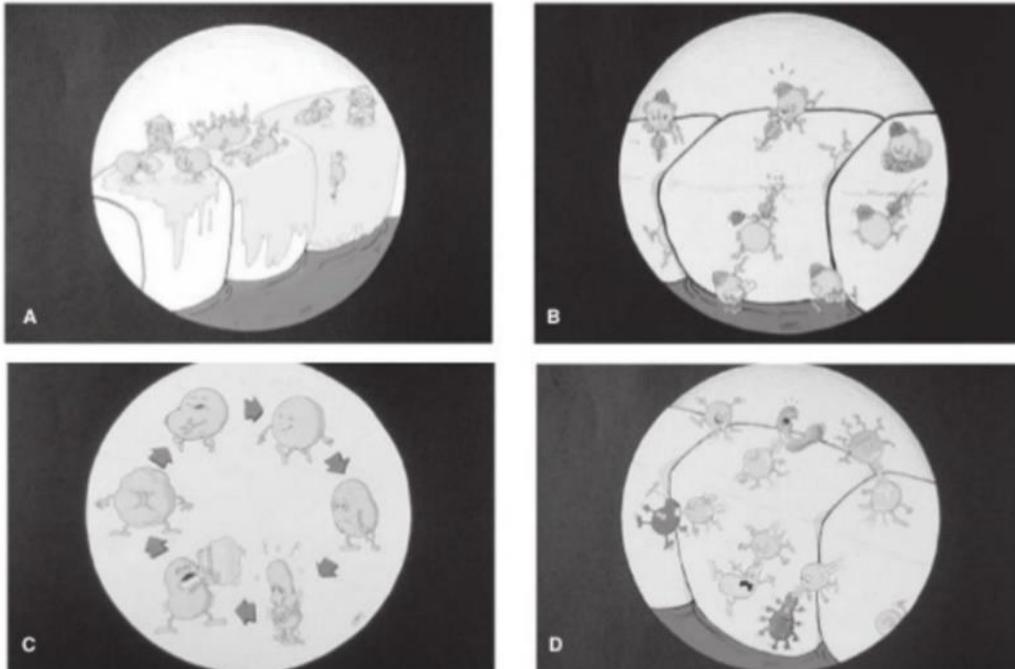


Figura 7. Representación en forma de dibujo de algunos factores de cariogenicidad de *Streptococcus mutans*. **A:** poder acidógeno, acidúrico y acidófilo. **B:** desmineralización del esmalte por los ácidos. **C:** efecto de la sacarosa en la síntesis de polisacáridos intracelulares. **D:** poder adhesivo de los polisacáridos extracelulares. Tomado de: (Liébana, 2002).

Estructuralmente no difieren del modelo general de todos los estreptococos, salvo en la ausencia de cápsula y en que las fimbrias que cuando existen, son poco prominentes. Poseen una capa mucosa compuesta de glucanos tanto solubles como insolubles, por lo que poseen glucosiltransferasas de bajo y alto peso molecular. Estas enzimas, localizadas primitivamente en la membrana citoplasmática, emergen sobrepasando la pared celular e incluso se excretan al medio favoreciendo los fenómenos de agregación por afinidad con los compuestos que originan. En la pared celular presentan proteínas frecuentemente antigénicas e involucradas en los fenómenos de fijación de glucanos, adhesión a la película adquirida y adhesión interbacteriana por interacciones proteína-proteína o lectina-carbohidratos que a veces se ve favorecida por la saliva gracias a la medición conjunta de cationes y glucoproteínas salivales (Lemos, *et al.*, 2013).

Para su aislamiento y posterior identificación se emplean diferentes medios de cultivo como son:

a) Sólidos

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

Tanto en **MSA** como en **MSB**, las colonias aparecen con una morfología variable, aunque con frecuencia poseen márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas y a veces rodeadas de una zona como gota de agua, debido a la producción *in vitro* de polisacáridos extracelulares.

En estos cultivos se aconseja una primera incubación durante 24 horas en anaerobiosis para favorecer su desarrollo y después otras 24 horas en aerobiosis para estimular la formación de polisacáridos extracelulares y, en su caso, la de peróxido de hidrógeno (Liébana, 2002).

b) Líquidos

- caldo cerebro-corazón o BHI
- caldo con soja tripsinizada o TSB y
- caldo Schaedler.

El crecimiento por lo general es de tipo granular y con algunos gránulos adheridos a las paredes de los tubos.

Estos cultivos deben ir tamponados y no incubarse más de 24 horas.

Tanto en los cultivos sólidos como líquidos la temperatura óptima debe ser 36 ± 1 °C.

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco.

Usualmente no producen hemólisis en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *Streptococcus mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *Streptococcus mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación (Hamada S y Slade HD., 1980).

En general se presentan dificultades técnicas para obtener muestras representativas de diferentes sitios orales y para aislar, cultivar y contar los microorganismos. No existe un solo método de cultivo para examinar la variable y compleja placa dental que satisfaga todas las condiciones necesarias. En algunos casos se requieren procedimientos estrictamente anaeróbicos. Afortunadamente, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse de varios sitios usando medios selectivos como el Agar Mitis Salivarius (MS). Aunque el Agar MS fue originalmente desarrollado para aislar estreptococos fecales, su uso ha

predominado sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, incluyendo *Streptococcus mutans*. En el agar MS, muchos estreptococos orales muestran una morfología característica de las colonias (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo) lo cual permite su diferenciación inicial.

Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmosfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días. Además de la morfología característica de las colonias, los estreptococos orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa (Linke HA., 1977, Carlos L. y Constanza M., 2005).

SALIVA

La saliva es un líquido que humedece la cavidad bucal, es secretada por todas las glándulas salivales (93% de las glándulas salivales mayores y un 7% de las glándulas salivales menores), las cuales se extienden por todas las regiones de la boca exceptuando la encía y la porción anterior del paladar duro. Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido crevicular, restos alimenticios, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral (Tenovuo JO., 1997).

La saliva se define como una secreción mixta producto de la mezcla de los fluidos provenientes de las glándulas salivales y del fluido crevicular. Contiene agua, mucina, proteínas, sales, enzimas, bacterias que normalmente residen en la cavidad bucal, células planas producto de la descamación del epitelio bucal, linfocitos y granulocitos degenerados llamados corpúsculos salivales los cuales provienen principalmente de las amígdalas. Puede variar la consistencia de muy líquida a viscosa dependiendo de la glándula que la produzca y la excrete dentro de la cavidad oral (Hernández y Aránzazu, 2012; García *et al.*, 2012).

La secreción diaria oscila entre 500 y 1500ml por día en un adulto, con un volumen medio en la boca de 1.1ml, constituyendo una de las secreciones más abundantes del cuerpo humano (Echeverri, 1995). Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo. En reposo, la secreción oscila entre 0.25ml/min y 0.35ml/min y procede sobre todo de las glándulas submandibulares y sublinguales. Ante estímulos sensitivos, eléctricos o mecánicos, el volumen puede llegar hasta 1.5ml/min. (Nauntofte B., 2003).

El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, alcanza su pico máximo alrededor del mediodía y disminuye de forma muy considerable por la noche, durante el sueño.

La saliva es un fluido biológico muy complejo y la mayoría de sus componentes son hidrofílicos, aunque también presenta componentes hidrofóbicos como la enzima lipasa, que se secreta en las glándulas de von Ebner. Esta enzima ayuda a descomponer los ácidos grasos introduciendo glóbulos de grasa (Hernández y Aránzazu, 2012).

La saliva es un líquido diluido, el cual contiene un 99% de agua y sirve como solvente para otros componentes que la forman y un 1% de sólidos disueltos; los cuales pueden ser diferenciados como: Componentes orgánicos proteicos que incluyen enzimas, inmunoglobulinas, glicoproteínas y albúminas y Componentes inorgánicos o electrolitos que contribuyen en la osmolaridad de la saliva como son: el sodio, potasio, cloruro y bicarbonato. Dichos componentes son importantes para tener una buena salud dental (Sreebny L, 1992).

La composición salival varía de sitio a sitio dentro de la boca de acuerdo a diferentes situaciones (hora del día, proximidad de las comidas) y sus propiedades son afectadas por el nivel de hidratación y la salud general del individuo (Echeverri, 1995; Hernández y Aránzazu, 2012).

La saliva tiene una función vital en la integridad de los tejidos orales. Participa en la limpieza de la cavidad oral de residuos de alimentos y bacterias, amortigua los efectos dañinos de ácidos y bases fuertes, proporciona iones para la remineralización de los dientes, tiene poder antibacterial, antiviral y antimicótico.

Además, participa en la masticación, deglutación y el habla (Zarate *et al.*, 2004; Echeverri, 1995; Lenander-Lumikari y Loimaranta, 2000).

Dentro de las funciones de la saliva se describió la participación de diferentes proteínas salivales que juegan un rol muy importante en la dinámica de la cavidad bucal ya que se les atribuyen propiedades antifúngicas y antimicrobianas, como la IgA secretoria, las mucinas, la lisozima, las glucoproteínas básicas, la lactoferrina, la peroxidasa y las histatinas, participan en la lubricación de la mucosa, contribuyen a aumentar la capacidad de la mucosa, contribuyen a aumentar la capacidad masticadora y promueven la remineralización. Además, también intervienen en un gran número de procesos biológicos, como el soporte celular, la tensión y la flexibilidad de los tejidos, la respuesta inmune y las reacciones enzimáticas; dentro de éstas están las glucoproteínas ricas en prolina y albúmina, las fosfoproteínas, tirosina, cistatina S, PRP's aniónicas, histatinas neutrales que regulan el mantenimiento de la integridad dental, las mucinas y cistatinas, que mantienen la integridad de las mucosas, el factor de crecimiento epidérmico, encargado de la reparación de los tejidos blandos, los bicarbonatos, fosfatos, urea, péptidos ricos en histidina, aminoácidos que regulan el mantenimiento del pH. La función que realizan está estrictamente relacionada con su estructura, la cual determina su mecanismo de acción (**Figura 8**) (Hernández y Aránzazu, 2012; García *et al.* 2012; Echeverri, 1995; Zarate *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2003).

Por la presencia de proteínas ricas en prolina; la capa de saliva sobre los dientes y la mucosa pueden crear superficies cargadas e influenciar las uniones microbianas, además de crear una capa de lubricación de protección contra el exceso de humedad, la penetración de ácidos y una débil barrera a la salida de minerales.

Los investigadores han identificado 309 proteínas en la saliva total y se calcula que entre 85% y 90% de las proteínas encontradas en la saliva son secretadas por células acinares (Hernández y Aránzazu, 2012; García *et al.*, 2012).

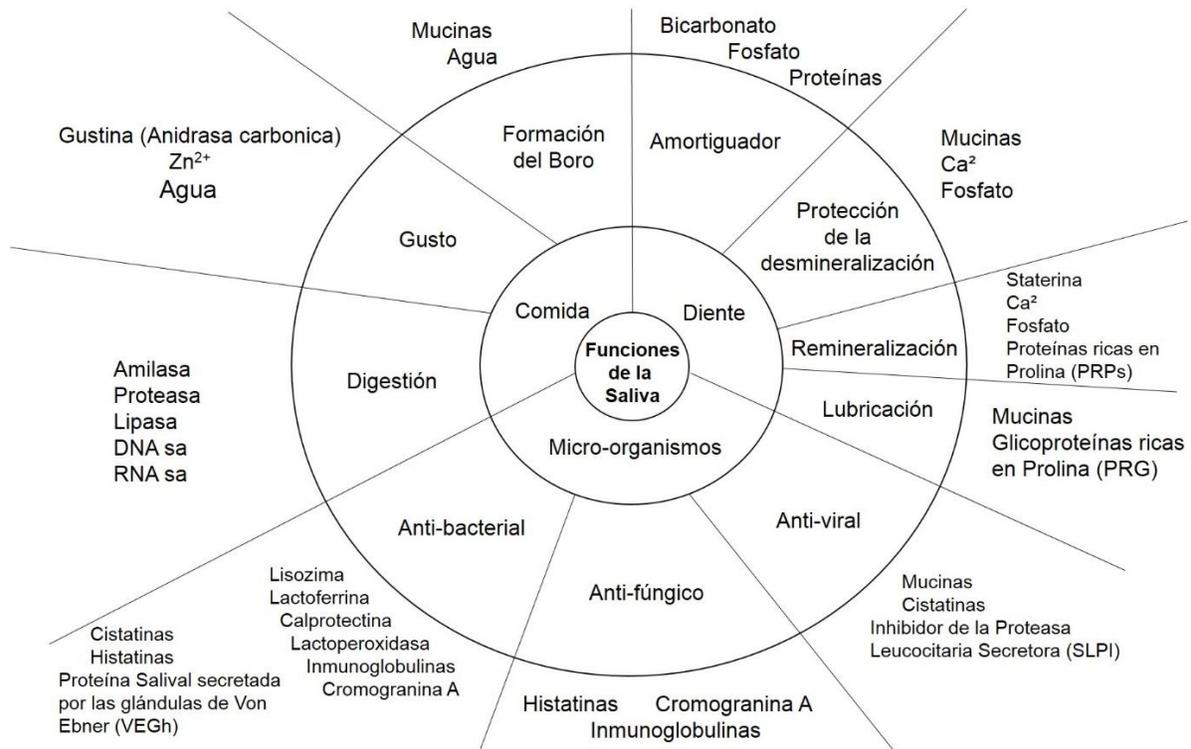


Figura 8. Presentación esquemática de las funciones principales de la saliva. Tomado de: Salivary glands and saliva 2002 (Nieuw Amerongen & ECI Veerman)

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Todos los organismos vivos tienen que defenderse del ataque constante de patógenos. En diferentes sitios, los microorganismos son tolerados y se mantienen en la superficie de las capas epiteliales, pero en otros sitios, como las vías aéreas bajas o el intestino delgado, la función de la interfase con el medio ambiente (intercambio gaseoso, absorción de nutrientes), podría comprometerse por microbios. Por esta razón las células epiteliales en esta localización, producen péptidos antimicrobianos (AMPs de sus siglas en inglés: Antimicrobial Peptides), que inhiben el crecimiento y/o establecimiento de bacterias, hongos, parásitos y virus envueltos (Castañeda- Casimiro, *et al.*, 2009; De Franco *et al.*, 2007).

Las características de los AMPs para funcionar como agentes antimicrobianos son: que poseen carga neta positiva (catiónicos), lo que permite

su interacción con los fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana o de otros patógenos; muestran anfipaticidad, es decir contienen regiones apolares (con aminoácidos hidrofóbicos) y regiones con cargas positivas (aminoácidos catiónicos, arginina, lisina o histidina), lo que facilita que posterior a la interacción de las regiones catiónicas con los fosfolípidos aniónicos, las regiones polares interaccionen con las cadenas polares de los fosfolípidos, lográndose la inserción del péptido en la membrana microbiana y son flexibles, lo cual permite la interiorización de los mismos hacia el citoplasma bacteriano (Hancock y Sahl, 2006).

El mecanismo de acción antiviral de los AMPs, es el bloqueo de la entrada del virus por la interacción con heparán sulfato, que es importante para la unión viral. Los AMPs que interactúan con el heparán sulfato son capaces de bloquear muchas infecciones virales; y la formación de especies reactivas de oxígeno, es el paso crucial en el mecanismo de acción antifúngica (Mettenleiter, 2002; Spillmann, 2001).

Los AMPs presentan una gran variedad de efectos biológicos entre los que encontramos la desgranulación y liberación de histamina de células cebadas, producción de IL-8 por células del epitelio pulmonar, modulación de la activación del complemento, inhibición de la producción de glucocorticoides, aumento en la proliferación de células T y producción de citocinas (Befus *et al.*, 1999).

Las bacterias patógenas interactúan con los AMPs en todos los órganos y tejidos. La conversión de cepas sensibles a resistentes a estos antibióticos naturales es difícil, pero no imposible. La resistencia de algunos patógenos humanos a estas moléculas de defensa del huésped no se considera hasta este momento como un factor de virulencia, sin embargo, se ha demostrado que las bacterias resistentes a AMPs presentan una mayor resistencia a antibióticos convencionales. El incremento de la patogenicidad de las cepas resistentes a AMPs y el conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a AMPs pueden aportar nuevos blancos para el desarrollo de terapias antimicrobianas para las enfermedades infecciosas (Castañeda- Casimiro *et al.*, 2009).

PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIMICROBIANOS (CAMPs)

Son pequeños péptidos cargados positivamente, actúan en contra de una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos. A causa de su amplio espectro de actividad, se les han considerado como posibles sustancias terapéuticas alternativas de agentes antimicrobianos convencionales (Lis *et al.*, 2013).

Recientes investigaciones han propuesto diferentes modelos para explicar el mecanismo de acción de los CAMPs y los han clasificado en: modelos de formación de poro transmembrana y modelos basados en la no formación de poros. Ambos modelos afectan la permeabilización de la membrana, la depolarización de la membrana, pérdida de iones vitales como de otros componentes celulares, lisis y muerte celular (Yang L, 2001). Hay gran aceptación de que los CAMPs operan a través de interacciones con blancos intracelulares o la interrupción de procesos intracelulares clave. Algunos péptidos se ha demostrado que actúan en la membrana celular como en sitios internos (Hancock, 1997).

HISTATINAS

Las histatinas son una familia de péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular y estructuralmente relacionados, ricos en residuos de arginina, histidina y lisina. A pH fisiológico presentan carga positiva (*catiónicos*). Se han identificado al menos 12 histatinas diferentes en la saliva, la mayoría de las cuales se origina por la degradación de dos moléculas originarias: la histatina 1 y la histatina 3 (Amerongen, 2002).

Como otras proteínas salivales, las histatinas son multifuncionales y su principal propiedad consiste su actividad anti-fúngica y antibacterial, basado en su

actividad asesina e inhibitoria de crecimiento en varias especies de bacterias orales.

Se cree que el mecanismo bactericida de los péptidos catiónicos se debe a la formación de poros en la membrana de las bacterias, aunque se sospecha que pueden ser múltiples los mecanismos (Amerongen, 2002; McDonald *et al.*, 2011).

Las histatinas pueden actuar como inhibidor competitivo de varias proteinasas, incluidas las cisteína proteinasas de mamíferos y bacterias. Al inhibir tales enzimas, las histatinas pueden afectar la evolución de enfermedades como la periodontitis en caso de destrucción proteolítica extensa de los tejidos periodontales (Lamont *et al.*, 2015).

La histatina 5 deriva de la histatina 3 y participa en la formación de la película adquirida, la neutralización de sustancias potencialmente nocivas, la quelación de iones metálicos, la inhibición de la inducción de citocinas inflamatorias y la inhibición de enzimas proteolíticas del hospedero y bacterianas. Tiene una estructura flexible: en el agua presenta una estructura enrollada azarosamente, pero en medio apolar puede adoptar una estructura en hélice alfa. Esto causa probablemente las características de unión a sustancias tan diferentes químicamente (Amerongen, 2002; McDonald *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que el péptido catiónico histatina-5 mata a *Candida albicans*, al inactivar sus mitocondrias, alterando el potencial transmembranal de este organelo, y aniquilando a la levadura por salida de iones potasio y ATP intracelular. Esto último se lleva a cabo por dos mecanismos, uno lítico (de la membrana citoplasmática, salida de K⁺) y otro no lítico (mecanismo de flujo del ATP), este fenómeno es similar al que se presenta en bacterias (Helmerhorst *et al.*, 2001).

TIPOS DE MICROSCOPIOS

Los microscopios son instrumentos que incrementan el tamaño de una imagen para poder visualizarla. Su uso en microbiología es esencial para el

diagnóstico, ya que permiten elegir el número de aumentos según la muestra que se desea visualizar. Para aumentos entre 100x y 2.000x se emplean microscopios ópticos (**Figura 9**), en los que la luz es la fuente de iluminación, no son útiles para mayores aumentos debido a su escaso poder de resolución. Para poderes de resolución mayores se requiere el uso de microscopios electrónicos que sustituyen la luz por haces de electrones y permiten visualizar partículas de menor tamaño como los virus; se caracterizan por un manejo más complicado y no suelen utilizarse de forma sistemática en los laboratorios de microbiología (Liébana, 2002; Karp 2009).



Figura 9. Microscopio óptico compuesto de fondo claro. Tomado de: Liébana, 2002.

Microscopios ópticos compuestos

Existen distintas clases de microscopios que se emplean en función de las necesidades de observación. Todos ellos llevan varios sistemas de lentes, de ahí el nombre de compuestos. Entre estos se encuentran: los de fondo claro, de fondo oscuro, de contraste de fases y de diferentes, depende de las propiedades de los materiales que atraviesan (**Tabla 3**) (Zuazo, 2001).

Tabla 3. Tipos de microscopios

Microscopio	Características	Utilidad
De fondo claro	<ul style="list-style-type: none">• Luz visible• Hasta 0,23 μ• Muestra sobre fondo brillante	<ul style="list-style-type: none">• Tinciones• Fácil uso
De fondo oscuro	<ul style="list-style-type: none">• Luz visible difractada• Muestra brillante sobre fondo oscuro	<ul style="list-style-type: none">• Microorganismos de difícil tinción
De contraste de fases	<ul style="list-style-type: none">• Luz difractada• Muestra con diferentes grados de brillo y contraste	<ul style="list-style-type: none">• Estructuras internas
De fluorescencia	<ul style="list-style-type: none">• Luz UV• Muestra fluorescente sobre fondo no fluorescente	<ul style="list-style-type: none">• Inmunofluorescencia• Auramina
Electrónico	<ul style="list-style-type: none">• Haces de electrones• Estructuras menores de 0,23 μ	<ul style="list-style-type: none">• Virus• Ultraestructuras

Tomado de: Liébana, 2002.

Microscopio electrónico

Se usa para objetos inferiores a 0.23 μ m como los virus o las estructuras internas de la célula. El poder de resolución es mayor porque la longitud de onda de los electrones es del orden de 100.000 veces menor que la luz visible. La fuente de iluminación se sustituye por haces de electrones y las lentes de vidrio por lentes electromagnéticas que enfocan el haz sobre la preparación a través de un tubo en el que existe el vacío. Los electrones así dirigidos pueden atravesar la muestra, denominándoseles de **transmisión**, o bien incidir sobre ella provocando la liberación de nuevos electrones; en este caso se conocen como de **barrido** (Salinas Casado, 2008).

MÉTODOS MICROSCÓPICOS DE OBSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS

Según las características de las bacterias, de la muestra e incluso de lo que se quiera observar en ella, puede recurrirse a distintas formas de visualizarlas. La

observación generalmente se realiza en fresco, mediante tinciones o por técnicas especiales (Liébana, 2002; Lamont *et al.*, 2015).

Examen en fresco

Permite visualizar las bacterias vivas e incluso observar sus movimientos. Si los microorganismos provienen de un medio o producto patológico líquido, se utiliza una gota del mismo, pero si procede de un medio sólido se incorpora un líquido isotónico como solución salina que conserve la forma bacteriana. Existen dos técnicas:

1. La Simple, en donde la suspensión bacteriana se observa entre portaobjetos y cubreobjetos; y
2. La gota pendiente, en la que dicha suspensión se coloca en un cubreobjetos sobre un círculo hecho con parafina o vaselina, se cubre con un portaobjetos excavado; luego se invierte la preparación, que, sellada, queda lista para su visualización durante un período más largo.

Normalmente, tanto en un caso como en el otro se usan aumentos de 100 a 400 (Liébana, 2002; Zuazo, 2001).

Exámenes tintoriales

Con el uso de los colorantes se pretende conseguir que los microorganismos contrasten nítidamente con el medio que los rodea, se destaquen sus características diferenciales y observar elementos estructurales. Se pueden efectuar tinciones tras la fijación de la muestra al portaobjetos con colorantes vitales que colorean células vivas. La fijación se suele realizar por calor y menos frecuentemente con compuestos químicos (Liébana, 2002).

Un fijador penetra pronto en la membrana celular e inmoviliza todo su material macromolecular, de modo que la estructura de la célula se

mantiene lo más similar posible a la de la célula viva. Los más comunes son el formaldehído, alcohol o ácido acético (Karp, 2009).

La observación se realiza normalmente con objetivo de 100x y aceite de inmersión. Existen varios tipos de tinciones; simples, diferenciales o compuestas, específicas, de fluorescencia y otras.

Simples. Se utiliza un solo colorante. Como las bacterias a pH 7 tienen una carga ligeramente negativa atraen colorantes básicos, mientras que los colorantes ácidos son repelidos por la mayoría y colorean sólo el fondo. Los primeros son, por ejemplo, violeta de genciana, azul de metileno, fucsina u otros, mientras que los segundos, que se utilizan en las tinciones negativas, son entre otros la eosina y la nigrosina. Las tinciones simples se llevan a cabo con la fijación de la muestra, se añade el colorante, transcurrido un tiempo se elimina éste con agua, y tras secar se observa con el microscopio. Permiten visualizar bien la morfología de las bacterias, ya que al ser poco agresivas dañan menos la forma original de éstas (Liébana, 2002).

Diferenciales o compuestas. Se utilizan para poner de manifiesto diferencias entre bacterias; se emplea más de un colorante. Las más utilizadas en microbiología son:

Tinción de Gram. Permite distinguir, en función de las características estructurales de su pared, entre los dos grandes grupos de bacterias, grampositivas y gramnegativas. Se inicia fijando la muestra por calor y se añade un colorante, el cristal violeta, que tiñe todas las bacterias del medio. Tras ello se fuerza la coloración con un mordiente de yodo. A continuación, se usa un decolorante, alcohol acetona, que hará perder el cristal violeta a las gramnegativas. En ese instante, las grampositivas siguen de color violeta, pero las gramnegativas no se ven al no estar coloreadas. Para visualizar éstas se usa el colorante de contraste, generalmente

safranina o fucsina, que las tiñe de rojo. De esta forma, finalmente, las bacterias grampositivas quedarán teñidas de violeta y las gramnegativas de rojo. Es la tinción más utilizada en microbiología, y, en muchos casos, se usa como el primer paso del diagnóstico directo (Liébana 2002).

Tinción de Ziehl-Neelsen o de ácido-alcohol resistencia. Con ella se distinguen las bacterias ácido-alcohol resistentes, micobacterias y bacterias de los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*. Este método de tinción es mucho más agresivo, y tras la adición del primer colorante, se realiza un calentamiento suave para forzar la penetración de éste en las bacterias. La decoloración se realiza con una disolución de alcohol clorhídrico en etanol y el colorante de contraste es el azul de metileno. Así, las bacterias **ácido-alcohol resistentes** se verán rojas, en comparación con el azul de las que **no son ácido-alcohol resistentes** (Liébana, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud en 2009 estimó que cinco mil millones de personas en el mundo han sufrido caries dental y esto correspondería casi al 100% de los habitantes del mundo, además de ser la principal causa de la pérdida dentaria en niños y adultos jóvenes. Sin embargo, no se encuentran datos más recientes publicados, pero se podría considerar que casi el 100% de la población actual en algún momento pudo padecer de caries dental.

Streptococcus mutans es el principal agente etiológico de la caries dental. La caries es una enfermedad infecciosa de distribución universal, de naturaleza multifactorial, dinámica crónica, transmisible y que afecta a la estructura dentaria como resultado de su interacción con los productos bacterianos. El resultado de esta interacción provoca una pérdida mineral de la superficie dental trayendo como consecuencia destrucción localizada de los tejidos duros. La caries dental es una de las enfermedades de mayor prevalencia entre la población general en el mundo occidental, puede considerarse una pandemia mundial por su distribución global y por la gravedad de las consecuencias por la pérdida dental.

El factor de virulencia más importante de *Streptococcus mutans* es la capacidad que tiene de formar biofilms, conocidos como placa dental que se ubican en la superficie del diente. Los biofilms están constituidos por comunidades bacterianas adheridas a la superficie del diente y su formación ocurre como respuesta a una gran variedad de señales ambientales. La importancia fundamental de estos biofilms es la capacidad que tiene de ser hasta 1000 veces más tolerantes a los antibióticos, y esto dificulta su tratamiento con medicina moderna. Se han realizado estudios orientados a explorar mecanismos antimicrobianos presentes en la cavidad oral específicamente en saliva, como son los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), que incluye, entre otros, a las histatinas que tienen actividad antimicrobiana y anti-fúngica. Debido a su amplio espectro de actividad de estos (CAMPs), se les han considerado como posibles sustancias terapéuticas alternativas de agentes antimicrobianos convencionales.

Se podría contemplar el uso de estos péptidos como terapia coadyuvante en la eliminación de algunas bacterias grampositivas o gramnegativas, si el blanco de éstos CAMPs incidieran en la membrana externa, esto facilitaría el acceso de otros fármacos clásicos a sus dianas intracelulares. Existen numerosos ejemplos de estas sinergias; betalactámicos más magaina sobre *E.coli*; buforina más azitromicina sobre *Cryptosporidium parvum* por mencionar algunos.

El problema de resistencia al uso de los antibióticos convencionales ha despertado el interés del desarrollo de CAMPs como agentes terapéuticos; sin embargo, el uso de éstos péptidos depende de varios factores a estudiar como su toxicidad, estabilidad e inmunogenicidad en el huésped. El creciente problema de resistencia a los antibióticos convencionales y la imperiosa necesidad de nuevas drogas ha estimulado el interés para identificar nuevas CAMPs, probar los ya conocidos y modificarlos eventualmente. El estudio de las histatinas incubadas con *Streptococcus mutans* y el análisis de los daños ultraestructurales en esta bacteria inducidos por ellas, nos permitirá determinar el daño morfológico generado por estos péptidos y plantear su posible utilidad como terapia alternativa de agente antimicrobiano.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La incubación de *Streptococcus mutans*, con histatinas o saliva ¿afectará la viabilidad y la morfología de *Streptococcus mutans*?

HIPÓTESIS

Las histatinas 5 producen daño irreversible en la pared celular de los *Streptococcus mutans*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir el daño ultraestructural de *Streptococcus mutans* causado por las histatinas 5.

Objetivos específicos

1. Cultivar a *Streptococcus mutans* en medio de cultivo Soya tripticaseína.
2. Establecer la dosis óptima de histatinas para inducir daño a los estreptococos.
3. Analizar por microscopía electrónica el daño en *Streptococcus mutans* producido por las histatinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de saliva

Se recolectó saliva total de 3 sujetos voluntarios en tubos Eppendorf estériles, no fumadores, adultos sanos entre 25 y 35 años hombres y mujeres. Los sujetos seleccionados no presentaron caries, gingivitis, periodontitis ni alguna condición oral o sistémica que pudiera afectar la composición de la saliva (Walter *et al.*, 2012). Los sujetos que aceptaron donar la saliva firmaron el consentimiento informado (Ver Apéndice).

Para minimizar los efectos circadianos, se recolectó saliva total entre 9 y 11 am de 3 sujetos sanos con previo cepillado y en ayunas. La saliva se estimuló por la masticación de parafilm de 25cm (Fisher Cientific, Pittsburg, PA). Los especímenes se mantuvieron en hielo durante su recolección, y se centrifugaron inmediatamente a 14,000 x g durante 20 min a -4°C. Se recuperó el sobrenadante de la saliva total y se almacenó en alícuotas de 250µl a -20°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Una vez realizados los experimentos con la saliva, bacterias e histatinas 5, se depositaron en una solución de hipoclorito de sodio al 10% y se esterilizaron en autoclave.

Cultivo Bacteriano

Los ensayos experimentales se realizaron con la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 donada gentilmente por el Dr. Rafael García. Las bacterias se incubaron en un matraz con 25ml en medio de cultivo TYS-333* a 37°C de 24 a 48 hrs. y en condiciones microaerofilicas. El crecimiento bacteriano se monitoreo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 675 nm y por el método de conteo de células viables, expresado en Unidades Formadoras de colonias (UFC).

Histatinas 5

Los ensayos experimentales se realizarán con *Streptococcus mutans* incubados con histatinas 5 (Sigma Aldrich Sigma St. Louis, MO), con saliva total y con saliva total e histatinas y como grupo control *Streptococcus mutans* incubados con amortiguador de fosfatos de sodio pH 5.2.

Incubación de *Streptococcus mutans* más saliva total, saliva más histatinas 5 e histatinas 5.

Procedimiento:

1. Se inoculó *Streptococcus mutans* en un matraz de 25 ml con medio de cultivo caldo Soya Trypticaseína y se incubó en condiciones de microaerofilia (que se logra con una vela encendida, en una jarra de anaerobiosis) durante toda la noche a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon las bacterias en dos tubos Falcon, se centrifugaron dos veces a 2000 rpm durante 5 minutos, los sobrenadantes se decantaron y el botón se resuspendió con solución tamponada de fosfatos pH 7.0.
2. Se determinó la densidad óptica de la solución en un espectro Jenway Genova, modelo Genova, Serie R0027 a una longitud de onda de 675 nm, para después igualarla con un tubo McFarland escala 3×10^7 UFC/ml, (como se puede observar en la tabla 1), la cual corresponde a una absorbancia de 0.031, se utilizó la solución tamponada de fosfatos pH 5.2.
3. Se realizaron diferentes diluciones para llegar a una concentración de 500,000 UFC/ml:
 - a) Se realizó una dilución (1:10) de 9 ml de buffer de fosfatos pH 5.2 más 1ml de la solución anterior (3×10^7 UFC/ml) para tener una concentración de 3×10^6 UFC/ml, se continuó diluyendo tomando 8.4ml

de buffer de fosfatos pH 5.2 más 1.4ml de la solución anterior (3×10^6 UFC/ml) para obtener las 500,000 mil bacterias.

b) Se prepararon 70 tubos Eppendorf con 1ml de la solución con 500,000 UFC/ml (considerando 10 tubos como control y los 60 tubos restantes se utilizarán como experimentales).

c) Todos los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con la ayuda de un Vortex de la siguiente manera:

- Se le agrega al grupo control 375µl amortiguador tamponado de fosfatos pH 7.0 (PBS).
- Los grupos experimentales se incubaron con 500 000 bacterias y con las siguientes concentraciones de saliva e histatinas; 375µl de saliva a una concentración de 325µg (proteína) contenidos en amortiguador tamponada de fosfatos pH 7.0; se adicionan 373µl/325µg (saliva) más 2µl/2µg de histatinas y 373µl de PBS 7.0 más 2µl/µg de histatinas.
- Se incubaron los tubos durante una hora en baño María a 37°C en agitación, transcurrido el tiempo (tiempo "0") se sembraron 10µl de los especímenes a una dilución 1:100 en agar Mueller-Hinton (BD Bioxon), y se vuelven a incubar en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 horas (Tiempo 24 hrs).
- Se sembraron en Agar Mueller-Hinton 10µl de los diferentes grupos de estudios, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se decantó y se agregó nuevamente las siguientes concentraciones de saliva e histatinas: 375µl de saliva a una concentración de 325µg (proteína) en amortiguador tamponada de fosfatos pH 7.0; se adicionan 373µl/325µg más 2µl/2µg de histatinas y 373µl de PBS 7.0 más 2µl/2µg de histatinas.
- Se incubaron nuevamente a 37° C en condiciones de microaerofilia todos los tubos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones 1:100 y 1:1000 de los grupos experimentales y se sembraron 10µl en agar Mueller-Hinton, se

incubaron a 37°C durante 24 horas y se contaron el número de unidades formadoras de colonia.

- Finalmente, todos los grupos experimentales se fijan en Karnovsky durante 1 hora a 4°C, se lavan con amortiguador de cacodilatos, una hora y se sigue la técnica de rutina para microscopia electrónica.

Tabla 1 Escala de MacFarland

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Determinación de las alteraciones de *Streptococcus mutans* incubados con histatinas

Las alteraciones ocasionadas por las histatinas en las bacterias, se evaluaron determinando las unidades formadoras de colonias (UFC) en *Streptococcus mutans* incubados únicamente en solución tamponada pH 7.0 y en *Streptococcus mutans* incubados con las histatinas 5, con saliva total y con saliva total e histatinas.

Para analizar los cambios ultraestructurales de *Streptococcus mutans* se obtuvieron 10 millones de bacterias tratadas con saliva total, saliva con histatinas e con histatinas 5, se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en fijador de Karnovsky (1,000 mosmol/kg) (Karnovsky, 1965), durante 2 horas a temperatura ambiente. Se siguió la técnica de rutina para microscopia y se incluyó los especímenes en resina (Spurr, 1969). Se realizaron cortes de 40 a 80nm, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se tomaron fotos en un microscopio electrónico JEOL 1200EX.

Los resultados obtenidos se evaluaron comparando el grupo experimental con las muestras controles incubadas en las mismas condiciones en ausencia de histatinas 5 o con saliva.

Análisis del daño en la pared celular y/o membrana plasmática de *Streptococcus mutans*

El análisis del daño en la pared celular y de la membrana plasmática de los *Streptococcus mutans* tratados con saliva e histatinas se realizó midiendo la distancia entre las bicapas de 70≤ bacterias bajo condiciones controles y experimentales a una amplificación de 7500 X utilizando el paquete procesador de imágenes Fiji e Image J.

Análisis estadístico

El análisis estadístico del daño ultraestructural en los *Streptococcus mutans* incubados con las diferentes condiciones experimentales se compararon con el grupo control utilizando el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple Student-Newman-Keuls. El análisis estadístico se realizó con el InStat Statistical program (GraphPad, San Diego, Calif).

RESULTADOS

Incubación de *Streptococcus mutans* con saliva, saliva más histatinas e histatinas expresados en unidades formadoras de colonias.

Streptococcus mutans incubado durante 24 hrs. con saliva a una concentración de 325µg/375µl y a una dilución 1:000 muestran una disminución significativa comparada con el grupo control, como se muestra en la figura 1A y B ($P \leq 0.0001$) (Grafico1).

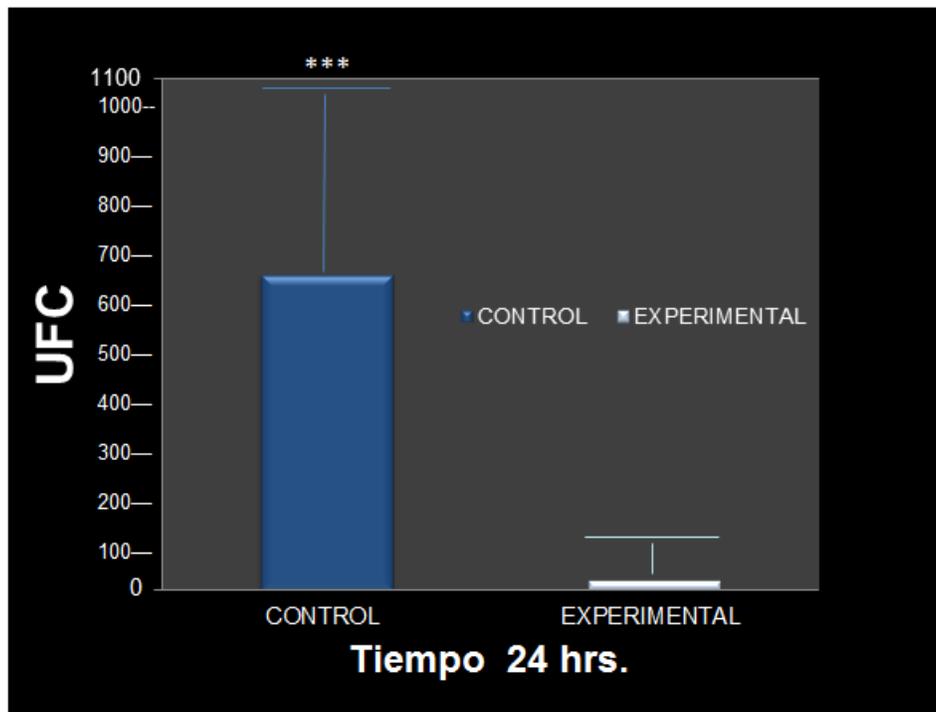


Grafico 1. *Streptococcus mutans* incubados con saliva (E) y con PBS (C) durante 24 hrs. a 37°C *** $P \leq 0.0001$.

En la figura 1C, se exhiben los resultados de la incubación de *Streptococcus mutans* con saliva e histatinas, se observa disminución de bacterias expresadas en UFC, comparados con las bacterias incubadas con solución salina tamponada como se observa en la figura 1D ($P \leq 0.0001$) (Grafico 2).

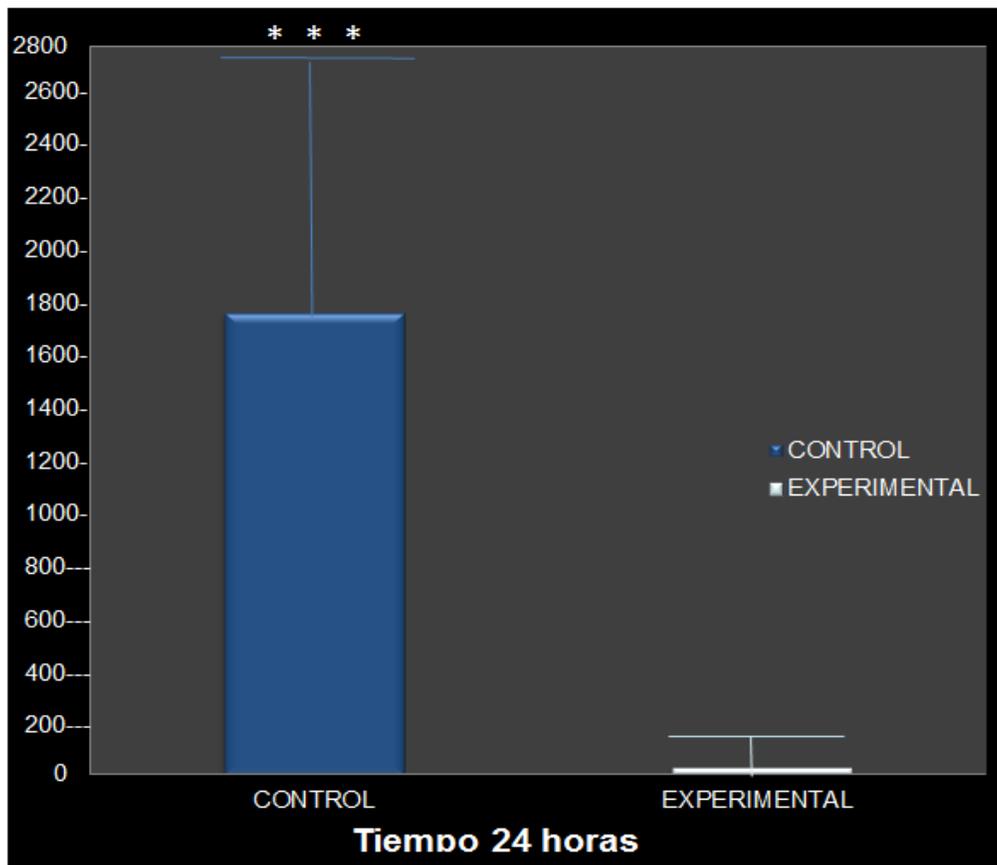


Grafico 2. *Streptococcus mutans* incubados con saliva e histatinas (E) y con PBS (C) durante 24 hrs a 37°C. ***P≤0.0001.

Los resultados de la incubación de *Streptococcus mutans* con histatina 5 muestran diferencias estadísticamente significativas, cuando se comparan con el grupo control, como se muestra en la figura 1D y E (P≤0.0001) (**Gráfico 3**).



Grafico 3. *Streptococcus mutans* incubados con histatina 5 (Figura 1E) y con PBS (Figura 1C) durante 24 hrs. *** $P \leq 0.0001$.

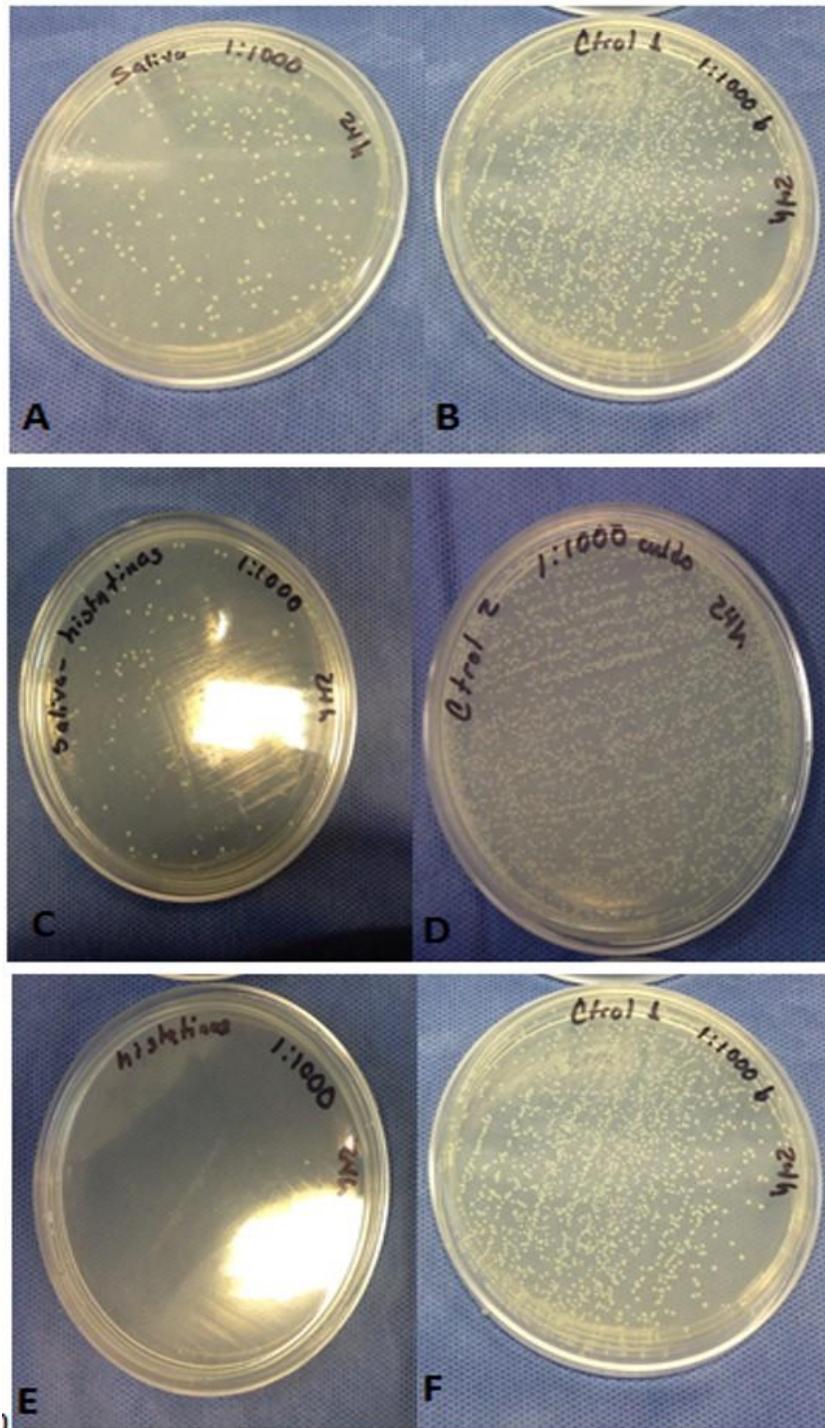


Figura 1. *Streptococcus mutans* incubados con: **A)** saliva, **B)** Amortiguador salino tamponada pH7.0, **C)** saliva más histatinas, **D)** Amortiguador salino tamponada pH 7.0, **E)** histatina 5 y **F)** Amortiguador salino tamponada pH 7.0.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Descripción morfológica de *Streptococcus mutans*

Los resultados obtenidos de la incubación de *Streptococcus mutans* con amortiguador salino de fosfatos durante 24 horas muestra imágenes de las bacterias que presentan la morfología característica de las bacterias gram positivas, como son; una capa en la superficie celular, continua y uniforme que corresponde a la mureína de la pared celular, por debajo de la cual se observa de tamaño variable la bicapa que constituye la membrana citoplásmica. En algunas bacterias que se encuentran en división celular se observa la proyección de la membrana citoplásmica al interior que en algún momento forma mesosomas característicos de la bacteria, como se observa en la figura 2A y B. La electrodensidad del citoplasma es homogénea y ésta electrodensidad disminuye en el nucleóide. En la figura 2B, también podemos apreciar la agrupación de los estreptococos formando cadenas y algunas bacterias se encuentran en división, se observa el septum característico de división binaria en la célula bacteriana, se exhibe un aumento del tamaño, así como replicación del ADN y de la pared celular, la membrana citoplasmática comienza a invaginarse a partir de direcciones opuestas formando una partición conocida como septum. A cada lado del septum se ubica una copia del cromosoma bacteriano como se observa en la figura 2B y los otros constituyentes celulares que le permitan a cada célula hija vivir como célula independiente. Posteriormente, quedan separadas como dos células hijas resultantes de la división de la célula madre original (figura 2B). Podemos apreciar en la figura 2A y B, la pared celular bien definida, en la que se observa una zona clara, que representa una capa de baja densidad que corresponde al espacio periplásmico y una oscura de alta densidad la membrana citoplásmica. En la figura 2A, se observa el espacio periplásmico que se encuentra ubicado entre la membrana externa de la membrana citoplásmica; se le considera un espacio acuoso y sus constituyentes en las bacterias gram positivas se encuentran interdigitados entre la malla de la pared celular.

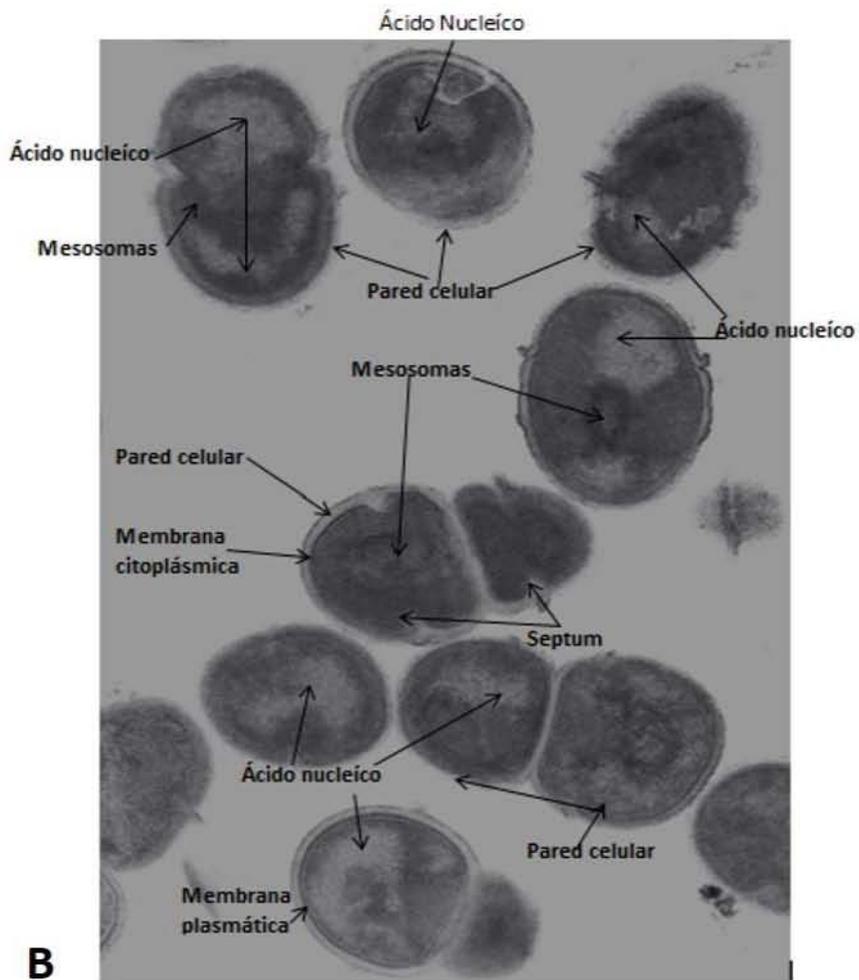
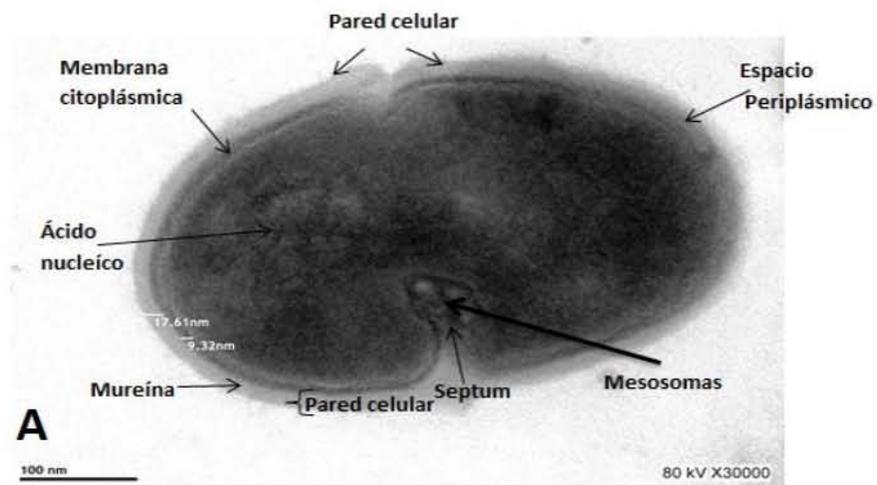


Figura 2. Morfología de *Streptococcus mutans*. **A** y **B** incubados con amortiguador salino de fosfatos durante 24 horas.

***Streptococcus mutans* incubados con saliva**

En las micrografías de los estreptococos incubados con saliva se observa desorganización de la pared celular (figura 3A), así como una malla desprendida del cuerpo celular, y solo es posible observar parte del peptidoglicano. En la figura 3B se muestran bacterias dañadas, con nucleóide picnótico, no es posible observar la pared celular, y la membrana citoplásmica presenta interrupciones. La membrana plasmática no es evidente en la mayoría de las bacterias, en las micrografías se muestra debris celular, que indica la presencia de restos bacterianos (figura 3A, B y C). También podemos observar desflecamientos en la pared celular que se observan como proyecciones y puntilleo en el citoplasma (figura 3C). En contraste, los estreptococos incubados en PBS, muestran electrodensidad homogénea del citoplasma y se observa la pared celular y la membrana citoplásmica íntegras (figura 3D) **Gráfico 4**.

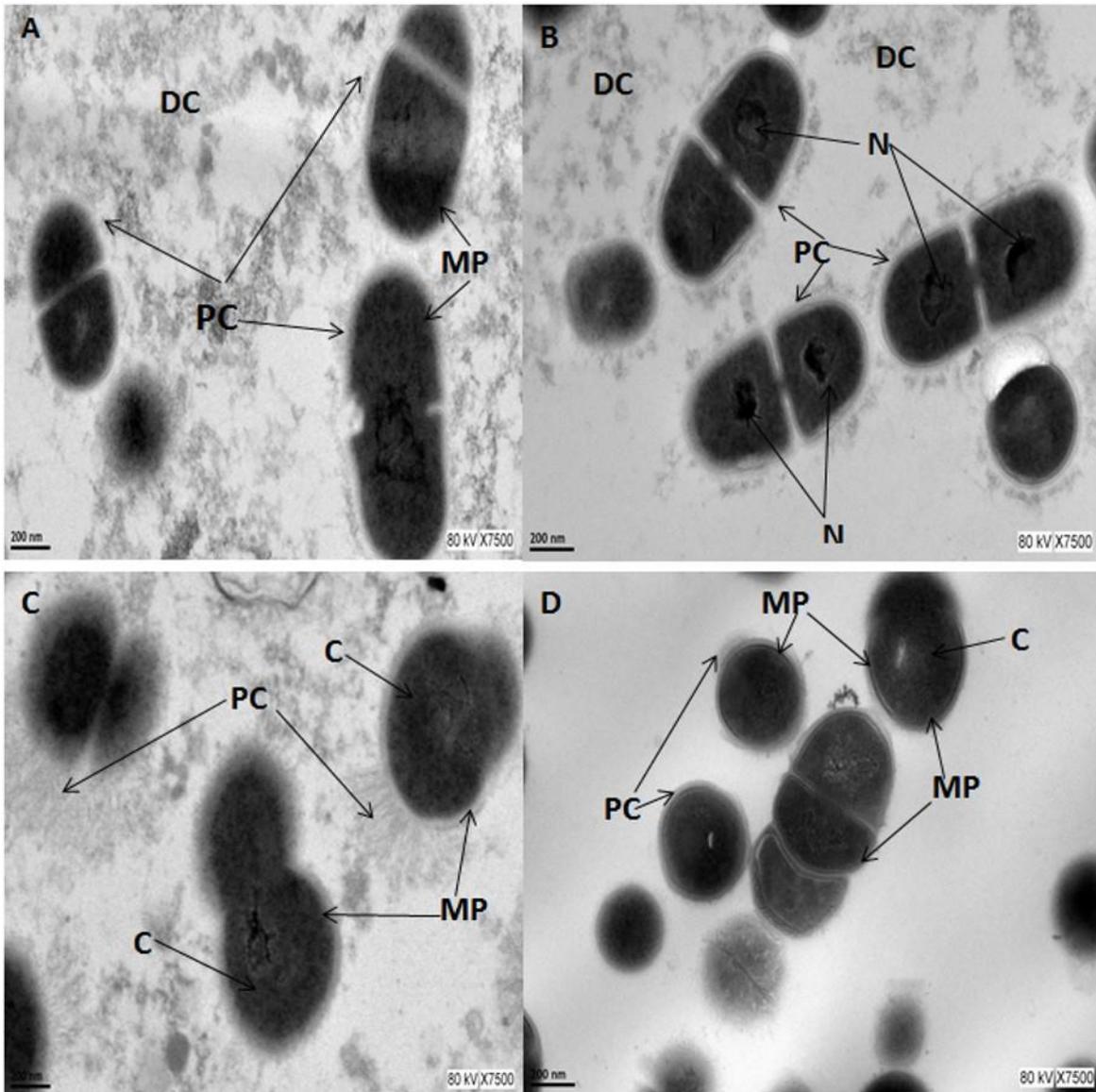


Figura 3. Fotomicrografías electrónicas de *Streptococcus mutans* incubados durante 24 hrs a 37°C con PBS o con saliva. **A)** La pared celular (PC) de las bacterias incubadas con saliva se observa dañada, la membrana plasmática (MP) no es visible y se observa debris celular (DC). **B)** Las bacterias muestran nucleóide picnótico, no se observa la pared celular y hay interrupciones en la membrana plasmática. **C)** Algunas bacterias muestran desflecamiento en la pared celular, debris celular y se observa puntilleo en el citoplasma bacteriano (C), no se observa la pared celular ni la membrana citoplásmica. **D)** Las bacterias incubadas en PBS muestran una morfología normal, agrupación en forma de cadena, la pared celular y la membrana plasmática están íntegras. La electrodensidad del citoplasma es homogéneo.

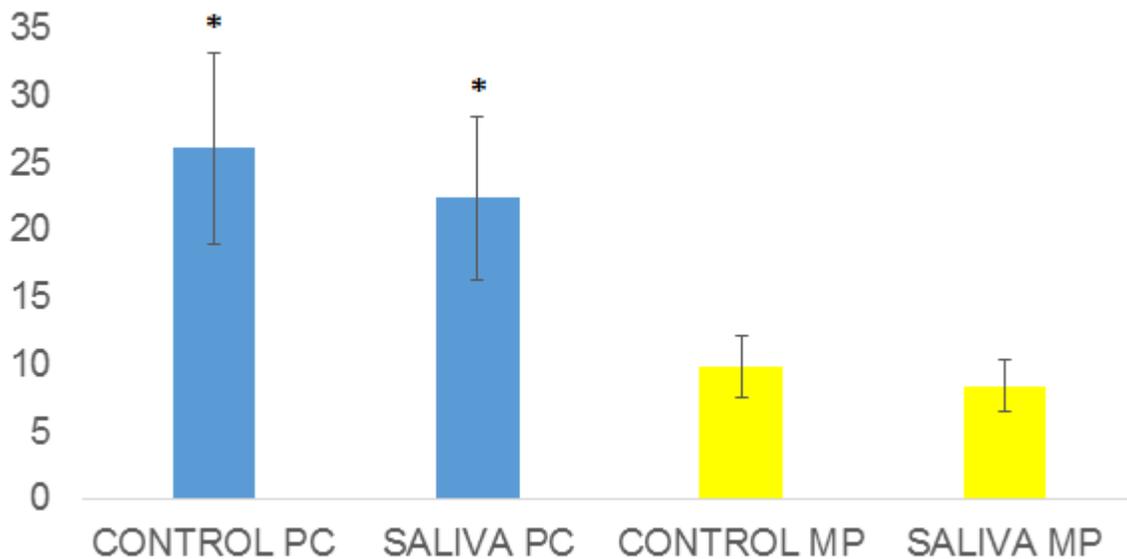


Gráfico 4. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de *Streptococcus mutans* tratadas con saliva. Las barras muestran el promedio \pm DE: Desviación Estándar . * $P < 0.001$. PC: Pared Celular; MP: Membrana Plasmática. $P \geq 0.05$

***Streptococcus mutans* incubados con saliva más histatinas 5**

Las bacterias incubadas por 24 horas con saliva e histatinas se encuentran dañadas, solo se observan restos de la mureína que presentan un aspecto irregular, la membrana plasmática se encuentra en algunas partes parcialmente interrumpida y algunas bacterias están completamente destruidas (Figura 4A). El peptidoglicano se observa festoneado en algunas bacterias e interrumpido; hay desflecamiento en la pared celular y desaparición de la membrana citoplasmica así como del peptidoglicano (Figura 4B).

El cambio más evidente se observa en el citoplasma con un patrón granular (Figura 4C y D). En la figura 4C es posible observar el nucléolo en posición excéntrico. Los estreptococos incubados en PBS muestran una morfología normal, la electrodensidad del citoplasma es homogénea, algunas bacterias están en división, la pared celular y la membrana citoplasmica están completas (Figura 4E)

Gráfico 5.

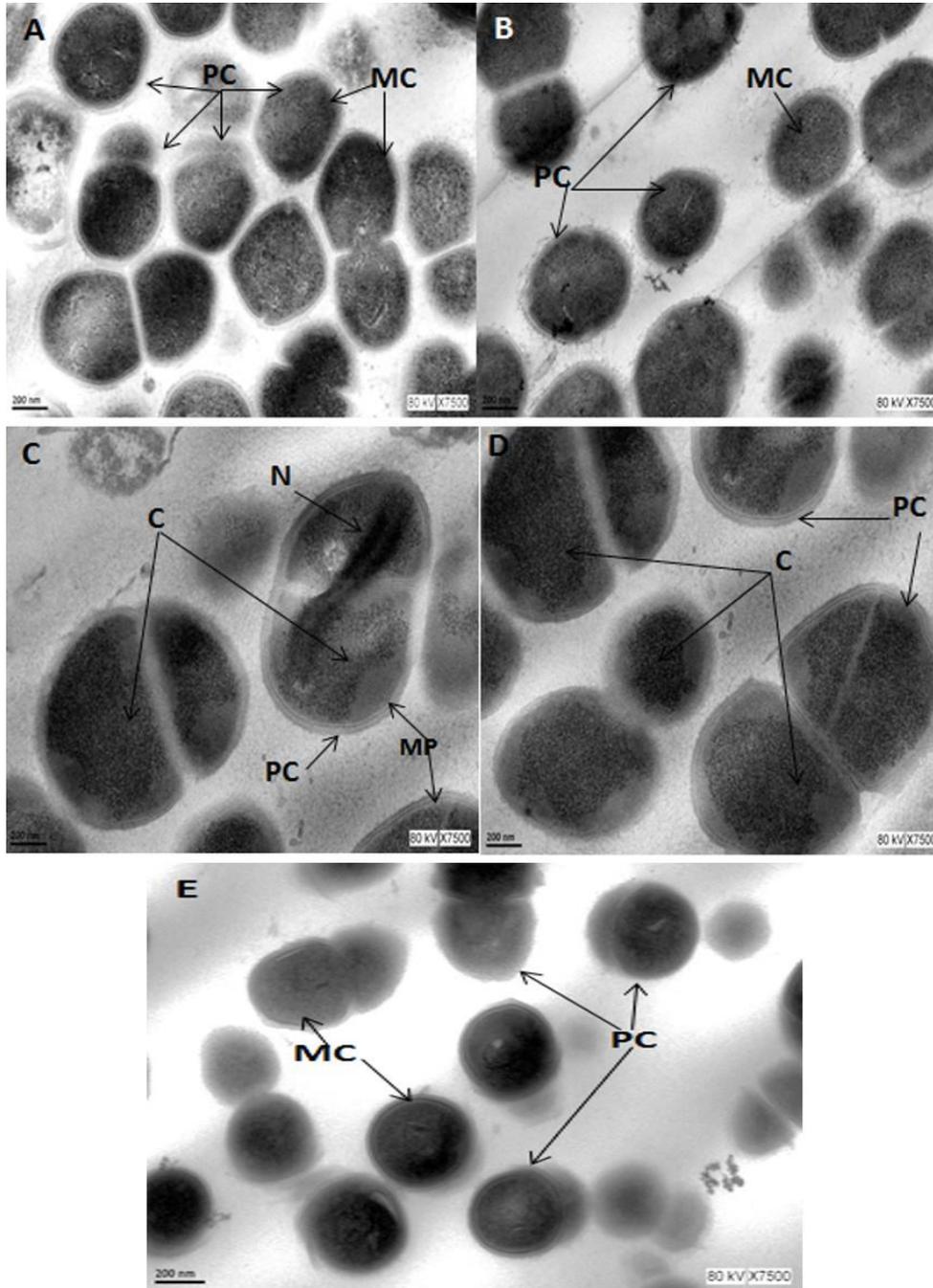


Figura 4. Fotomicrografías de estreptococos incubados por 24 hrs. con Saliva e histatinas o PBS. **A)** Las bacterias presentan morfología irregular, no se observa la mureína de la pared celular (PC) ni la membrana citoplásmica (MC). **B)** El peptidoglicano se observa festoneado y el citoplasma (C) granuloso. **C)** Se observa el nucléolo (N) en posición excéntrica. **D)** La pared celular y la membrana citoplásmica no se observa en algunas bacterias. **E)** Los estreptococos incubados en PBS muestran morfología con pared celular y membrana citoplásmica íntegra.

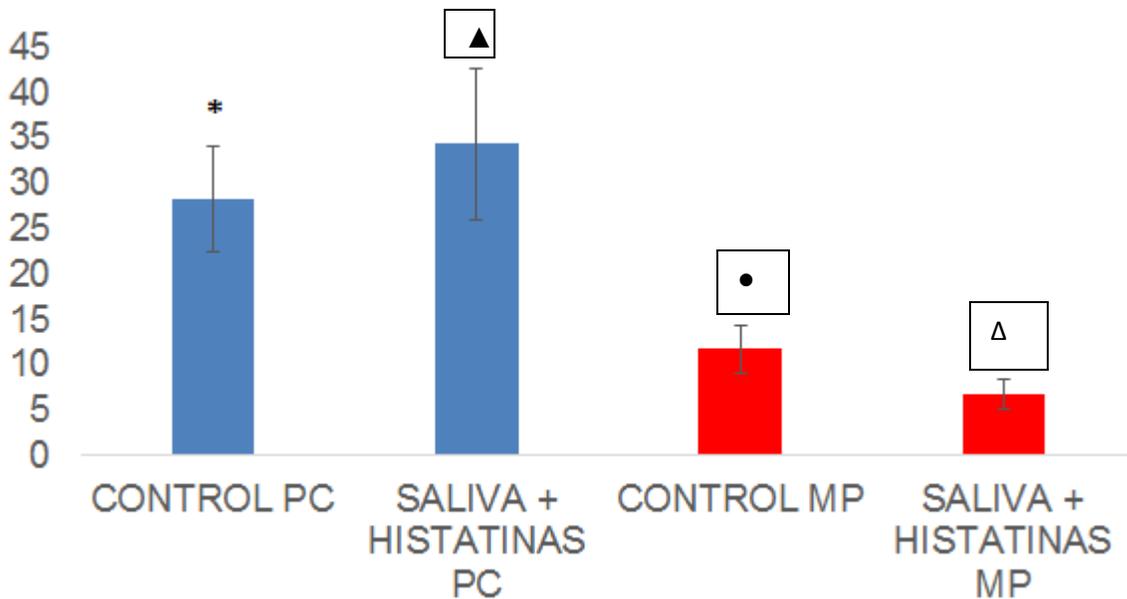


Gráfico 5. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de *Streptococcus mutans* tratadas con saliva e histatinas. Las barras muestran el promedio \pm D.E.Desviación Estándar * $P \leq 0.001$. PC: Pared Celular; MP: Membrana Plasmática.

***Streptococcus mutans* incubados con histatina 5**

Los estreptococos incubados con histatinas presentan menor daño en la pared celular y en la membrana citoplásmica que los observados en las bacterias incubadas con saliva y con histatinas más saliva (figuras 5A-D). En la figura 5A se aprecia el nucleoide picnótico y mureína (peptidoglicano) que en algunas bacterias se observa irregular, festoneada y separada del resto del cuerpo bacteriano. Se observa salida del material citoplásmico y destrucción total del cuerpo celular. En las figuras 5A-D se observa en algunas bacterias la interrupción de la membrana citoplásmica y en algunos sitios mayor destrucción de la pared celular con respecto al resto del cuerpo. En la figura 5D, se observan zonas claras en el citoplasma, sugerentes de salida del material citoplásmico. La electrodensidad del citoplasma se observa disminuida en la mayoría de las bacterias incubadas con histatinas (figuras 5A-D). Las bacterias incubadas en PBS, presentan una

morfología normal, la electrodensidad del citoplasma es homogéneo y presentan pared celular y membrana citoplásmica integra (figura 5E) **Gráfico 6.**

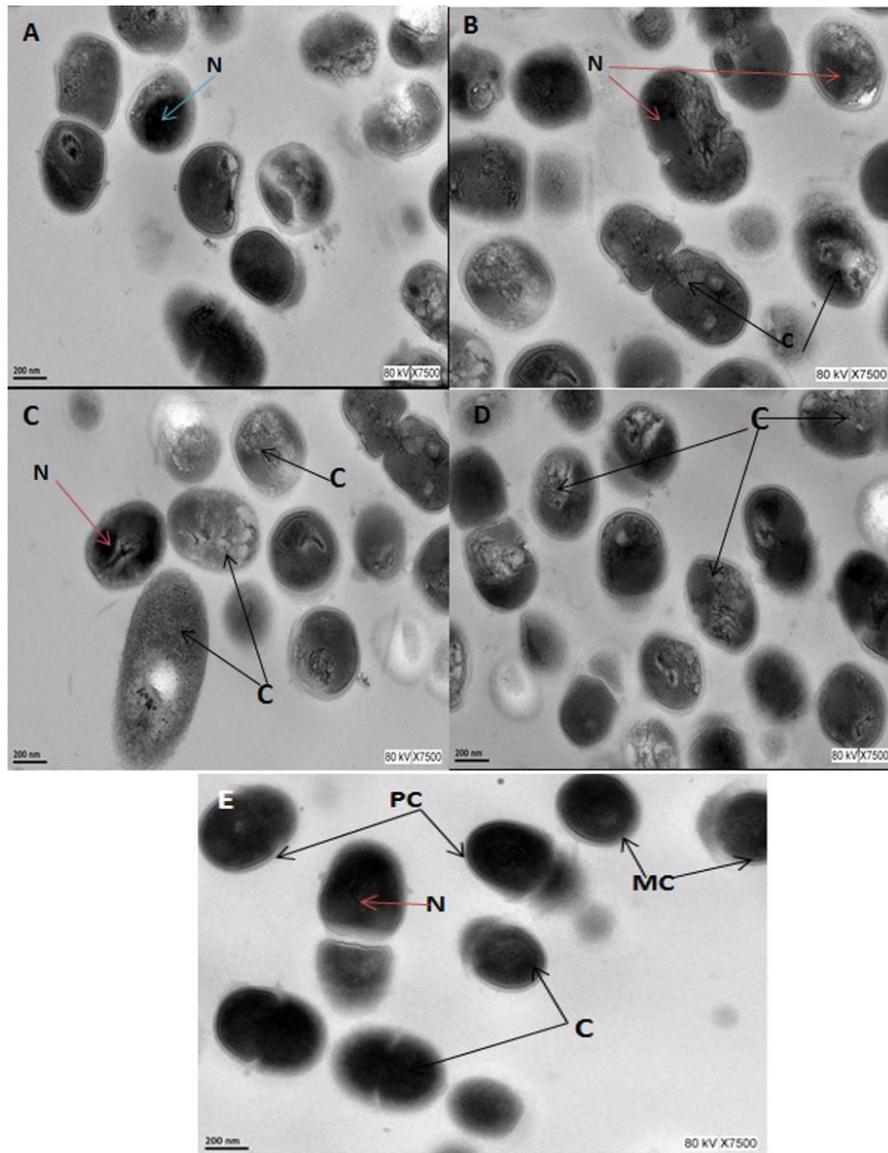


Figura 5. Fotomicrografías electrónicas de *Streptococcus mutans* incubados con histatinas o PBS. **A)** Las bacterias muestran nucleoide picnótico (N) y citoplasma (C) con zonas vacías. **B)** Los estreptococos presentan nucleoides picnóticos y la electrodensidad del citoplasma esta disminuida. **C)** Se observan bacterias con daño morfológico severo, no se observa la pared celular (PC) ni la membrana citoplásmica (MC), el citoplasma muestra cambios en su densidad. **D)** Las bacterias muestran daño principalmente en el citoplasma con disminución en su electrodensidad. **E)** Bacterias con morfología normal, pared celular y membrana plasmática completa.

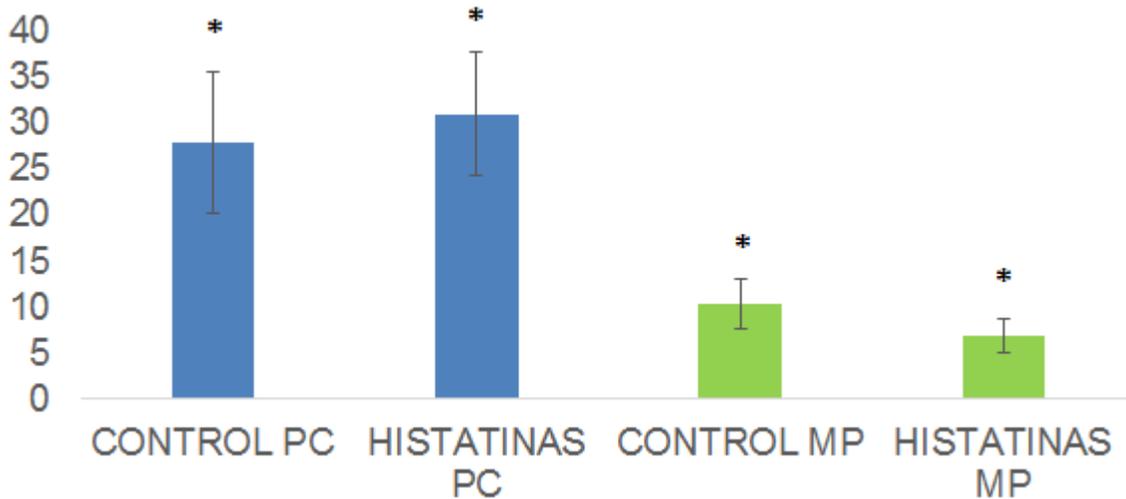


Gráfico 6. Distancia de la pared celular y de la bicapa de la membrana plasmática de *Streptococcus mutans* tratadas con histatina 5. Las barras muestran el promedio \pm D.E. * $P \leq 0.001$. PC: Pared Celular; MP: Membrana Plasmática.

Análisis estadístico.

El principal daño en la pared celular de los estreptococos incubados con saliva comparados con los incubados en PBS fue la interrupción de la mureína $P \leq 0.001$, en la membrana plasmática no se observaron cambios $P \geq 0.05$. En los estreptococos incubados con saliva e histatina e histatinas 5 se observó mayor daño en la pared celular comparada con el control $P \leq 0.001$ y hubo disminución en la distancia de la bicapa de la membrana plasmática comparada con el control $P \leq 0.001$ (Tabla 1).

GRUPOS	PARED CELULAR (PC)			MEMBRANA PLASMÁTICA (MP)		
	Total	Dist.	Media ± Desv.est	Total	Dist.	Media ± Desv.est
Control	92		26.058 ± 7.061	92		9.783 ± 2.262
<i>S. mutans</i> con Saliva	88		22.348 ± 6.021	88		8.404 ± 1.887
Control	79		28.247 ± 5.865	79		11.786 ± 2.615
<i>S. mutans</i> con Saliva e histatinas	107		34.345 ± 8.338	107		6.825 ± 1.670
Control	91		27.918 ± 7.636	91		10.423 ± 2.685
<i>S. mutans</i> con histatinas	120		30.970 ± 6.757	120		6.848 ± 1.918

Tabla 1. Análisis estadístico de las alteraciones de las membranas, Dist.: Distancia media entre la pared celular (PC) y la bicapa de la membrana citoplásmica (MC).

DISCUSIÓN

La cavidad oral provee un ambiente cálido y húmedo propicio para el desarrollo de numerosos microorganismos. Se encuentra expuesta a un amplio espectro e impredecible cantidad de microorganismos, de tal manera que la flora oral es extremadamente compleja, de ahí la importancia de contar con la presencia de múltiples mecanismos de defensa para prevenir infecciones. La saliva es un complejo fluido biológico que presenta múltiples funciones fisiológicas como son; la lubricación, limpieza y la digestión de alimentos.

La saliva es secretada por las tres principales glándulas salivales (parótida, submandibular y sublingual) y por otras glándulas salivales menores. Se han descrito componentes sanguíneos en la cavidad oral provenientes vía fluido crevicular-gingival, vía mucosa como trasudado mucoso, y por sangrado intraoral, y como resultado, se encuentran en cavidad oral una mezcla compleja de una gran variedad de moléculas frecuentemente denominada “saliva mixta” o saliva completa. La saliva juega un importante papel físico-químico, así como de defensa inmune innata de cavidad oral y del tracto gastrointestinal superior; de las superficies mucosas (por ambas vías mediante acción antimicrobiana directa y como por aglutinación y exclusión de microorganismos).

La saliva es indispensable para la curación de lesiones en la mucosa, heridas y úlceras. (Fabian *et al.*, 2008a; Fabian *et al.*, 2008b), por lo que las heridas presentes en la boca tienen una curación total, en la mayoría de las veces. Se han descrito más de 200 proteínas distintas y péptidos derivados de la saliva y la mayoría de estos péptidos provienen de la proteólisis. (Leone & Oppenheim, 2001). Dentro de éstos péptidos se encuentran incluidos las histatinas salivales y péptidos homólogos que juegan un papel importante en la salud de la cavidad oral, ya que tienen un amplio espectro de actividades antimicrobianas directas contra hongos y bacterias orales patógenas (Nishikata *et al.*, 1991; Blondelle & Houghten, 1992). Las histatinas junto con las defensinas y catelicidinas representan la principal familia de péptidos antimicrobianos (PAMs) (Melino *et al.*, 2014). Debido

al carácter anfipático débil de las histatinas, se les ha atribuido que su actividad frente a su blanco microbiano es por diferentes mecanismos (Oren & Shai, 1998).

Los mecanismos que han sido propuestos para explicar sus propiedades antibacterianos son variados e incluyen; la interrupción de la membrana celular, pérdida del sistema de electrones en la mitocondria, privación de metales esenciales como el hierro, cobre y zinc que son necesarios para la vida de los patógenos, y la generación de especies reactivas de oxígeno vía complejos II de cobre (Oppenheim *et al.*, 1988; Tay *et al.*, 2009; Melino *et al.*, 2014). La histatina 5 es un producto truncado de la hidrólisis de la histatina 3 y es la más abundante de todas las histatinas, ejerce una importante acción anti-candidina contra *Candida albicans* (Swidergall & Ernst, 2014). Los histatina pertenecen a los PAMs que son ricos en aminoácidos de histidina (Khurshida *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha demostrado que algunos polipéptidos ricos en histidina aislados de la glándula parótida tienen actividad bactericida y bacteriostática para diferentes cepas de *Streptococcus mutans* (MacKay *et al.*, 1984).

Estudios realizados por Huo *et al.*, 2011 mostraron la actividad antimicrobiana de lactoferrina e histatina 5 contra diferentes cepas de estreptococos, que al ser tratados con histatina 5 eran susceptibles a su acción. Más aún, la localización de éstos péptidos acoplados a un fluorocromo en la bacteria, mostraron que la histatina es capaz de penetrar la pared celular y acumularse en el citoplasma de *Streptococcus mutans* indicando que pueden penetrar la pared celular y la membrana celular y acumularse en el interior de la célula bacteriana.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que después de la incubación de estreptococos con saliva, el principal daño en la bacteria era a nivel de la pared celular y que la membrana plasmática en algunas partes estaba interrumpida, los daños ocasionadas en la bacteria por la saliva son en gran parte inducidos por las enzimas contenidas en la saliva como son; la lisozima que rompe los enlaces β -(1-4) glucosídicos del peptidoglicano (Krzyściak *et al.*, 2015), degradando la malla de mureína de la pared celular con la eventual muerte de la bacteria. La saliva también contiene lactoferrina que es una glicoproteína catiónica

unidora de hierro, tiene la capacidad de unir y secuestrar hierro privando a los microorganismos esenciales para su crecimiento.

La lactoferrina tiene una carga positiva neta y sus propiedades catiónicas es un importante factor que conduce a la unión y destrucción de las membranas celulares microbianas (Wiesner & Vilcinskas, 2010) y probablemente puede actuar es formando poros en la membrana celular (Chapple *et al.*, 1998).

También participan las α -defensinas salivales (HNPI, HNP2, HNP3 y HNP4) producidas por neutrófilos granulocitos y las β -defensinas (hBD1, hBD2, hBD3 y hBD4), son producidas por las células de la mucosa y ambas se encuentran presentes en el fluido gingival-crevicular y presentan amplia actividad bacteriana basándose en su carácter de péptidos catiónicos (Wiesner & Vilcinskas, 2010; Gorr, 2009).

Estas propiedades le permiten inducir muerte bacteriana. Su primera interacción con las bacterias esta mediada por su carga positiva neta, los péptidos catiónicos se unen mediante interacciones electrostáticas a la superficie de la membrana de la célula bacteriana con carga negativa que conduce a su posterior agregación e integración en la bicapa lipídica (Brodgen, 2005). La integración de la defensinas en las membranas bacterianas resulta en la formación de canales iónicos, poros transmembranales, interrupción y ruptura de membranas. La presencia en la saliva de catelicidinas (hCAP) que es un péptido alfa hélice catiónico, participa importantemente en el daño a las bacterias mediante su agregación en las membranas microbianas y destrucción vía formación de canales iónicos, poros transmembranales interrupción y ruptura de la membrana, mecanismo de acción muy parecido al que presentan las defensinas.

Los inhibidores secretorios de proteasas de leucocitos (SLPI) presentes en saliva son producido por los keratinocitos de la mucosa oral (Wiesner & Vilcinskas, 2010; Jana *et al.*, 2005); así como por los neutrófilos granulocitos provenientes del fluido gingival crevicular. Los SLPI al ser polipéptidos catiónicos ricos en cisteína tienen la capacidad de ejercer su actividad antimicrobiana como lo ejercen las defensinas y catelicidinas. Más aun, la presencia de adrenomedulina (Gröschl,

2009; Gorr, 2009; Kapas *et al.*, 2001) con carácter catiónico permite matar a las bacterias por el mismo mecanismo descrito para las defensinas, y catelicidinas (Allaker *et al.*, 2003a; Allaker *et al.*, 2006b). Las mucinas salivales especialmente la MUC7, presenta una alta afinidad para los microorganismos, los atrapa y los aglutina (Fabian *et al.*, 2008; Gorr, 2009).

Las peroxidases salivales que se clasifican en lactoperoxidasa (producida por las glándulas salivales) y las mieloperoxidasas (producidas por neutrófilos granulocitos) se encuentran también en el fluido gingival crevicular. Ambos sistemas catalizan la oxidación de iones de tiocinato (SCN) por peróxido de hidrogeno, y conduce a la producción de un agente más bactericida el llamado hipotiocinato (OSCN-) (Ashby, 2008).

Las aglutininas salivales (SAG) son receptores Scavenger (glucoproteínas ricas en cisteínas, actúan como receptores de reconocimiento de patrones, por lo que tienen la capacidad de unir a un amplio rango de patógenos orales incluyendo a las bacterias (Malamud, 2011). La calprotectina tiene propiedades de unión a iones (Gorr, 2009), inhibe el crecimiento bacteriano actuando como catión divalente (Mn^{2+} , Zn^{2+}) (Corbin *et al.*, 2008), se encuentra en saliva proveniente de células epiteliales orales y granulocitos neutrófilos y del fluido gingival-crevicular (Kido *et al.*, 1999).

Las proteínas del choque térmico HSP70/HSPAs que se originan en las glándulas salivales en las células de la mucosa y en el fluido gingival-crevicular son capaces de atrapar y aglutinar bacterias 46. , (Fabian *et al.*, 2007; Fabian *et al.*, 2008a; Fabian *et al.*, 2008b) Existen datos recientes que sugieren que tienen la capacidad de unir a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis* (Fabián *et al.*, 2008c; Anand *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha hipotetizado que la actividad fungicida de histatina 5 se inicia por la unión a la superficie de homólogos del HSP70/HSPAs de *Candida albicans* (Ssa1p, Ssa2p) seguido por la internalización y su muerte (Li, X.S *et al.*, 2004; Li, X.S., 2006).

Por último, la histatinas salivales son péptidos catiónicos ricos en histidinas, son secretados por las glándulas sublinguales y submandibulares (Johnson *et al.*, 2000; Gorr, 2009).

La histatina 5 es derivado la escisión proteolítica de histatina 3. Como péptido catiónico tiene la capacidad adsorber vía fuerzas electrostáticas las membranas celulares de las bacterias cargadas negativamente conduciendo a la agregación de las histatinas seguido a su integración a la bicapa lipídica (Wiesner & Vilcinskis, 2010; Brodgen, 2005), su integración a la membrana bacteriana conduce probablemente a la formación de canales iónicos, poros transmembranales, interrupción y ruptura de las membranas (Diamond *et al.*, 2011).

La presencia de las proteínas y/o péptidos presentes en saliva explican el daño tan severo que se observó en *Streptococcus mutans* después de su incubación en saliva. Por otro lado, la presencia del nucleoide picnótico en las bacterias, sugiere que daño en la pared celular y en la membrana plasmática sería el inicio del daño para su posterior acumulación en el citoplasma, alcanzando su blanco final que sería el nucleoide y la muerte de la célula bacteriana, sería por un mecanismo de apoptosis-like. Las bacterias incubadas con saliva e histatinas muestran daño severo similar a los observados en las bacterias incubadas solamente con saliva, pero el daño más sobresaliente, es el aspecto granular del citoplasma, este aspecto podría atribuirse a una desintegración de los ácidos nucleicos, inducido por las histatina 5, para ser sustituidos por el material granular que ocupa mayor espacio que los ácidos nucleicos. El daño observado en el citoplasma bacteriano podría atribuirse a la acción de las histatinas, ya que después de la incubación de las bacterias con saliva, no se observó este aspecto en el citoplasma.

Los resultados de la incubación de los estreptococos con histatina 5 muestran mayor daño en el citoplasma, con la presencia de vacuolas, sugerentes de salida de material citoplásmico con disminución de la electrodensidad del citoplasma, en algunas bacterias observamos interrupciones en la pared celular y la membrana plasmática; sin embargo, estos daños no son tan evidentes como los

observados en estreptococos incubados con saliva e histatinas y saliva, según resultados obtenidos por el grupo de Huo *et al.*, ellos mostraron que los estreptococos incubados con histatina 5 no presentaban cambios en la pared celular ni en la membrana plasmática y que ésta se acumulaba en el citoplasma, por lo que concluyeron que la histatina 5 es capaz de penetrar membranas bacterianas, sin interrumpir la integridad de las membranas, acumularse en el citoplasma y que podría ser el DNA bacteriano su blanco.

Nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos con Huo *et al.*, 2011; en los que observaron que en el citoplasma de los estreptococos se acumulaban las histatinas y que muy probablemente su blanco sea el nucleóide ya que, nosotros observamos que en los estreptococos incubados con histatinas hay picnosis en el nucleóide que es sugerente de muerte celular por un mecanismo de apoptosis. En lo que no coincidimos con ese grupo de investigación, es que nosotros observamos tanto en estreptococos incubados con saliva, saliva e histatinas y únicamente con histatina 5 interrupción de la pared celular y de la membrana plasmática, esto sugiere que hay daño en la pared celular, traduciéndose en desflecamiento de ésta, y daño en la mureína y probablemente, la histatina se dispone paralela a la membrana citoplasmática, orientándose perpendicularmente y se insertan en la membrana formando poros (Brogden, 2005) y desorganización de la bicapa, que se traduce en disminución en su tamaño, como se observó en bacterias incubadas con saliva $P \geq 0.05$; mientras que con saliva e histatinas se encontraba más hinchada la membrana plasmática del grupo experimental comparado con el control $P \leq 0.05$ y con histatina 5 $P \leq 0.001$.

CONCLUSIONES

Los principales hallazgos en este estudio fueron que la saliva y la histatina 5 presentan actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* y que histatina 5 es capaz de penetrar pared celular y membrana plasmática induciendo interrupción de los mismos, desorganización del ácido nucleico y producción de picnosis nuclear.

Con base a estos resultados, podemos sugerir, que la histatina 5 podría ser un valioso candidato en el desarrollo de terapias antimicrobianas para combatir la caries dental y también para sintetizar drogas antiinfecciosas que sean capaces de evadir la aparición inevitable de la resistencia bacteriana a los antibióticos de amplio espectro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ajami Behjatolmoolok, Abolfathi Ghazale, Mahmoudi Eftekhar and Mohammadzadeh Z. Evaluation of Salivary Streptococcus mutans and Dental Caries in Children with Heart Diseases. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015; 9 (2): 105-108.
2. Allaker, R.P.; Kapas, S. Adrenomedullin and mucosal defense: Interaction between host and microorganism. *Regul. Peptides*, 2003; (112): 147–152.
3. Allaker, R.P.; Grosvenor, P.W.; McAnerney, D.C.; Sheehan, B.E.; Srikanta, B.H.; Pell, K.;Kapas, S., Mechanisms of adrenomedullin antimicrobial action. *Peptides* 2006b; (27): 661–666.
4. Amerongen AVN. Salivary glands and saliva. Number 2. Saliva- the defender of the oral cavity. *Oral Dis*. 2002; (8):12-22.
5. Anand, P.K.; Anand, E.; Bleck; C.K.E.; Anes, E.; Griffiths, G. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PLoS One* 5,doi: /journal.pone.0010136. 2010; (10):1371
6. Ashby, M.T. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J. Dent. Res*. 2008; (87): 900–914.
7. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*. 2001; (76): 111-118).
8. Blondelle SE & Houghten RA Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochem A. State Courts*. 1992; (31): 12688–12694.
9. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol*. 2005; (3): 238 –250.
10. Chapple, D. S., D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Gant and R. E. Evans. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect Immun*. 1998; 66 (6):2434-2440.
11. Corbin, B.D. et.al. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 1999; (163): 947-953.

12. Costalonga Massimo and Herzberg Mark C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*. 2014; (162): 22-38.
13. Cuadrado Vilchis D.B, Peña Castillo R.E y Gómez Clavel J.F. El concepto de caries: hacia un tratamiento no invasivo. *Rev. ADM*. 2013; 70 (2): 54-60.
14. De Franco A L y col. Locksley RM, Robertson M. Immunity. The immune response in infectious and inflammatory disease. *Primers in Biology*. USA: New Science Press. Ltd. Sinauer Associates: Inc. Publishers. Sunderland, MA, 2007; 387.
15. Diamond, D.L.; Kimball, J.R.; Krisanaprakornkit, S.; Ganz, T.; Dale, B.A. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J. Immunol. Methods*, 2011; (256): 65–76.
16. Duque de Estrada Riverón J, Pérez Quiñonez J.A e Hidalgo-Gato Fuentes LI. *Revision Bibliográfica Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerer*. Fac. de Ci. Méd. de Matanzas, (Cuba). 2006; (43):
17. Echeverri M.T. La saliva: componentes, función y patología. *REV. ESTOM. Cali (Colombia)*. 1995; 4(2); 5(1): 1-104.
18. Escribano M, Matesanz P BA. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2005; 17(2):79–87).
19. Fábíán, T.K.; Fejérdy, P.; Csermely, P..Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: The emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases. *Curr. Genomics* 2008a; (9): 11–21.
20. Fábíán, T.K.; Fejérdy, P.; Csermely, P. Saliva in Health and Disease (Chemical Biology of). In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 1st ed.; Begley T.P., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.:Hoboken, NJ, USA, 2008b; (4): 1–9.
21. Fábíán, T.K.; Fejérdy, P.; Nguyen, M.T.; Sóti, C.; Csermely, P. Potential immunological functions of salivary Hsp70 in mucosal and periodontal defense mechanisms. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007; (55) 91–9.

22. García J., Muñoz J. Estructura bacteriana. En: García J., Picazo J. Microbiología médica general. 1ra edición. Madrid-España. McGraw-Hill Interamericana de España. 1996; 41-51.
23. García Triana B.E., Soto Olayo D., Lavandero Espina A.M. y Saldaña Bernabeu A. Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Rev. Habanera de Ci. Méd.* 2012; 11 (4): 450-456.
24. Gispert AE, Rivero LA, Cantillo EE. Relación entre el grado de infección por estreptococos mutans y la posterior actividad cariogénica *Rev Cub Estomatol*; 2000; 37 (3):157-61.
25. Gorr, SU. 2009; Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2000; (51): 152–180.
26. Gröschl, M.; Wendler, O.; Topf, H.-G.; Bohlender, J.; Köhler, H. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: Stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. *Regul. Peptides*, 2009; (154): 16–22.
27. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews. J.Clin Microbiol.* 1980; (2):331–84. 1977; 5 (6): 604–9.
28. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006; (24):1551-7.
29. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; (98): 1437-1442.
30. Hernández Castañeda A.A y Aránzazu Moya G.C. Características y propiedades físico-químicas de la saliva: una revisión. *Ustasalud.* 2012; 11 (2): 101-111.
31. Huo Lijun., Zhang Kai., Ling Junqi., Peng Zhixiang Peng., Huang Xinagya., Liu Hongyan., Gu Lisha Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments oh human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2011; (56): 869-876.

32. I.A. Pretty, K.R. Ekstrand. Detection and monitoring of early caries lesions: a review. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015;(17): 35-37
33. Jana, N.K.; Gray, L.R.; Shugars, D.C. Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: A role of SLPI in innate mucosal immunity. *J. Virol.*, 2005; (79): 6432–6440.
34. Johnson, D.A.; Yeh, C.K.; Dodds, M.W.J. Effect of donor age on the concentration of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Arch. Oral Biol.*, 2000; (45): 731–740.
35. Kapas, S.; Bansal, A.; Bhargava, V.; Maher, R.; Malli, D.; Hagi-Pavli, E.; Allaker, R.P. Adrenomedullin expression in pathogen-challenged oral epithelial cells. *Peptides*, 2001; (22): 1485–1489.
36. Karp Gerald. *Biología Celular y Molecular*. 5ta. Edición. *Mc Graw-Hill Interamericana*. 2000; 333 -- 345
37. Kido, J.; Nakamura, T.; Kido, R.; Ohishi, K.; Yamauchi, N.; Kataoka, M.; Nagata, T. Calprotectin in gingival crevicular fluid correlated with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 1999; (26): 653–657.
38. Krzyściak W, Jurczak A, Piątkowski J, Kościelniak D, Gregorczyk-Maga , Kołodziej , Papież MA, Olczak-Kowalczyk D. Effect of histatin-5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms in in vitro conditions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015; (69):1056-66.
39. Lamont Richard J., Hajishengallis George N. y Jenkinson Howard F. 2015,. *Microbiología e inmunología oral. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.*
40. Lemos José A., Quivey Robert G., Koo Hyun Jr and Abranches Jacqueline. *Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm Microbiology*. 2013; (159): 436 -445.
41. Lenander-Lumikari M. and Loimaranta V. Saliva and Dental Caries. *Adv Dent Res*. 2000; (14): 40-47.
42. Leone CW & Oppenheim FG Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001; (65);, 1054–1062.

43. Li, X.S.; Reddy, M.S.; Baev, D.; Edgerton, M. Candida albicans Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J. Biol. Chem.* 2003; (278): 28553–28561.
44. Li, X.S.; Sun, J.N.; Okamoto-Shibayama, K.; Edgerton, M. Candida albicans cell wall Ssa proteins bind and facilitate import of salivary Histatin 5 required for toxicity. *J. Biol. Chem.* 2006; (281): 22453–22463.
45. Liébana Ureña José. *Microbiología Oral*. 2da. Edición. Mc graw-hill interamericana. 2002; 17-25.
46. Linossier AC, Valenzuela CY. Colonización de la cavidad oral por Streptococcus grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev Chil Infect.* 2011; (283): 230–7.
47. Lis Maciej, Bhatt S., Schoenly N. Lee A. Y., Nislow C. and Bobek Libuse A. Chemical Genomic Screening of a *Saccharomyces cerevisiae* Genomewide Mutant Collection Reveals Genes Required for Defense against Four Antimicrobial Peptides Derived from Proteins Found in Human Saliva. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(2): 840-847.
48. Luján Hernández E. Luján Hernández M. y Sexto N. Factores de riesgo de caries dental en niños. *Rev. Electr. de las Ci. Méd. en Cienfuegos. Medisur.* 2007; 5(2):
49. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on Streptococcus mutans. *Infect Immun.* 1984; 44 (3): 695-701.
50. Malamud, D.; Abrams, W.R.; Barber, C.A.; Weissman, D.; Rehtanz, M.; Golub, E., Antiviral activities in human saliva. *Adv. Dent. Res.* 2011; (23): 34–37.
51. McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 2011; 90 (2): 268-72.
52. Melino S., Santone C., Di nardo P., Sarkar B. Histatins: salivary peptides with copper (II) and zinc (II) binding motifs. Perspective for biomedical applications. *The FEBS Journal*, 2014; (281): 657-672.

53. Mettenleiter TC. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res* 2002; (82): 3-8.
54. Murray Patrick R., Rosenthal Ken S. and Pfaller Michael A. *Microbiología médica*. Elsevier España. 2009; 4-14.
55. Nauntofte B, Tenevuo JO, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. *Dental Caries. The disease and its clinical management*. Oxford. Blackwell Munksgard; 2003; 7-29.
56. Nguyen, M.T.; Fábíán, T.K.; Singh, M.; Csermely, P.; Söti, C. Bacterial binding and opsonizing effect of extracellular Hsp70. (Abstract No: YSF-85). *FEBS J.*, 2008; 275, 460.
57. Nishikata M, Kanehira T, Oh H, Tani H, Tazaki M & Kuboki Y Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; (174): 625–630.
58. Od RMA, Carlos L, Od MC, Constanza M, Od VR, C SJG. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “in vitro.” *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2005; 3 (3): 25–30.
59. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem*: 1988; 263(16):7472-7
60. Oren Z & Shai Y Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 1998; (47): 451–463.
61. Peterson Scott N., Snesrud Erik, Schork Nicholas J. y Bretz Walter A. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J*. 2011; 61 (1): 11-22.
62. Sánchez Vega y Tay Zavala, *Fundamentos de Microbiología y Parasitología Médicas* 2003; 161--170
63. Salinas Casado J. El estudio de la orina. Luis Cifuentes Delatte en el paso del arte a la ciencia. *Arch Esp Urol* [Internet].
- Fundamentos de Microbiología y Parasitología Médicas* ed. Mendez Editores 2008; 61 (10): 166.170.

64. Siqueira Walter L., Bakkal Meltem. Xiao Yizhi, Sutton Jennifer N. and Mendes Fausto M. Quantitative Proteomic Analysis of the Effect of Fluoride on the Acquired Enamel Pellicle. *PLoS ONE*. 2012; 7 (8):
65. Spillmann D. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 2001; (83): 811-817.
66. Sreebny L, Baum B, Edgar W, Epstein J, Fox P, Larmas M. Saliva: Its role in health and diseases. *Int Dent J*. 1992; (42): 291-304.
67. Struzycka Izabela.. The Oral Microbiome in Dental Caries. *Polish Journal of Microbiology*. 2014; 63 (2): 127-135.
68. Swidergall M., Ernst J. Interplay between *Candida Albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryotic Cell*. 2014; 13(8): 950-957.
69. Tanzer, J. M. Microbiology of dental caries, In J. Shots and M. A. Taubman (ed.), *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby Year Book Inc., St Louis, Mo. 1992 377–424.
70. Tay WM, Hanafy AI, Angerhofer A, Ming LJ. "Metal Binding of Histatin 5 and Oxidative Activity of Its Copper Complex—A Possible Role of Salivary Copper in Antimicrobial Activity" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 6709–6712.
71. Tenovuo JO. Salivary parameters of relevance for assesSing caries activity in individuals and populations. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1997; (25): 82-6.
72. Valero P., Castillo A., Liébana J. Estructura de las bacterias (I). Elementos de envoltura. En: Liébana J. *Microbiología oral*. 2da edición. Madrid-España. McGraw-Hill Interamericana de España. 2002; 25-38.
73. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrelstave model or toroidal model A case study on melittin pores. *Biophys J*. 2001; (81): 1475-1485.
74. Yao Yuan, Berg Eric A., Costello Catherine E., Troxler Robert F. and Oppenheim Frank G. Identification of Protein Components in Human

- Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (7): 5300-5308.
75. Zárata Daza Arith Nallely, Leyva Huerta Elba Rosa y Franco Martínez Fernando Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija (estudio piloto). *Rev. Odonto. Mex.* 2004; 8 (3): 59-63.
76. Zuazo Silva JL. Microscopía y coloraciones. En: Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco M, Zuazo Silva JL, editores. *Microbiología y parasitología médicas*. TI. La Habana: ECIMED; 2001; 1928.
77. Wiesner, J.; Vilcinskas, A. Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immunesystem.. *Virulence*. 2010; (1): 440–464.
78. W. J. Chazin, E. P. Skaar; Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008; 319, 962–965.
79. (<http://etimologias.dechile.net/?caries> 22/06/2015)
80. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidad_es.html Dr. José Molina López Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 24/06/15)
81. (<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf> María Catalina Pérez. 5/07/15)

APÉNDICE

SOLUCIONES TAMPONADAS

Buffer pH 5.2

Para realizar 100ml se necesita:

0.14g de Fosfato potásico PM 136.091

0.12g de Cloruro de Sodio PM 58.44

Agregar en 80ml de agua Milli Q el fosfato potásico y el cloruro de sodio, ajustar el pH a 5.2, aforar a 100ml y filtrar con filtros de 0.22 μ m. Mantener a -4°C.

Buffer pH 7.0

Solución A

En un vaso de precipitado se agregan 500ml de agua Milli Q y se agrega 0.69g de NaH₂PO₄-H₂O y 4.25g de NaCl.

Solución B

En un vaso de precipitado se agregan 500ml de agua Milli Q y se agrega 0.71g de Na₂H₂PO₄ y 4.25g de NaCl.

Se toma de la solución A 140ml y de la solución B 360ml, se ajusta el pH 7.0, se afora a 500ml y se esteriliza.

Histatinas

Para hacer alícuotas de histatinas se colocó 1ml de solución tamponada 7.0 en el frasco original de las histatinas. De éste frasco se tomó 100µl y se colocaron en tubos Eppendorf. Las alícuotas se mantuvieron a -20°C.

Medio Soya Trypticaseina

Disolver 30g del medio soya trypticaseina en 1L de agua bidestilada, calentando ligeramente hasta disolver. Colocar en cajas de Petri y esterilizar a 121°C. durante 15 min.

Fórmula aproximada para 1000ml de agua bidestilada:

- Peptona de caseína 17.0g
- Peptona de soya 3.0g
- Cloruro de sodio 5.0g
- Fosfato Dipotásico 2.5g
- Dextrosa 2.5g

CUESTIONARIO PARA DONACIÓN DE SALIVA

Donante N°

Fecha: /...../

Apellidos:

Nombres: Sexo: Edad:

Lugar y fecha de nacimiento:

Domicilio: Localidad:

Teléfono:

Ocupación: E-mail:

EXAMEN FÍSICO

Peso: kg Estatura: cm Inspección general:

Tensión arterial MmHg Padecimiento actual.....

CONDICIONES GENERALES

- 1.Sentirse bien en el día de la donación y gozar de buena salud.
- 2.Tener entre 25 y 30 años.
- 3.Consultar si recibe vacunas, antibióticos u otros medicamentos.

IMPEDIMENTOS PARA DONAR:

- 1.Enfermedades cardíacas (dolor en el pecho, infarto, etc.), pulmonares, asma bronquial, tuberculosis activa, hipertensión arterial no controlada.
- 2.Haber padecido accidente cerebrovascular, epilepsia (convulsiones), lipotimias o desmayos.
- 3.Anemia, trastornos de la coagulación, cáncer.

4. Enfermedades renales, diabetes en tratamiento con insulina, úlcera gastroduodenal en actividad, colitis ulcerosa.
5. Enfermedades bucodentales (caries, enfermedad periodontal, úlceras, lesiones)
6. No fumadores.

Si usted se encuentra incluido dentro de los impedimentos detallados, NO PODEMOS ACEPTARLO/A COMO DONANTE.

En este caso, si lo desea, puede no entregar el cuestionario.

Si usted reúne las condiciones necesarias para donar, marque con una X en el casillero SÍ.

SÍ NO