

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DECANATO**



**TESIS**

***Análisis in silico de la Competencia y Coexistencia entre  
Streptococcus sanguinis y Streptococcus mutans en el biofilm  
dental.***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Percy Omar Túllume Vergara.**

**PATROCINADOR:**

**Ph.D. Pedro Jorge Chimoy Effio.**

**Lambayeque – Perú**

**2014**



# UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”



## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

**TÍTULO: Análisis *in silico* de la Competencia y Coexistencia entre  
*Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans* en el biofilm  
dental.**

### TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:  
Br. Percy Omar Túllume Vergara.**

**APROBADO POR:**

.....  
**Mario Cecilio Moreno Mantilla**  
JURADO, Presidente

.....  
**Martha Vergara Espinoza**  
JURADO, Secretaria

.....  
**Félix Gonzales Flores**  
JURADO, Vocal

.....  
**Pedro Jorge Chimoy Effio**  
PATROCINADOR

**Lambayeque – Perú  
2014**

**DEDICATORIA:**

Este trabajo de investigación está dedicado a la memoria de las personas que me apoyaron en toda mi etapa estudiantil, mi madre Carmen Túllume Mechán y por sus consejos a mi abuelita Rosaría Mechán Gonzales (Q.P.D.)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al culminar el presente documento siento una especial satisfacción porque representa el final a un largo y arduo trabajo de mañana, tarde y a veces de noche para entregar este documento.

Mis sinceros agradecimientos al Dr. Pedro Chimoy Effio, patrocinador del presente trabajo, por su orientación y siempre bien dirigidos consejos a lo largo del desarrollo de mi desarrollo como profesional. Gracias amigo.

Agradecimientos a mis Co-asesores Dra. Wendy Gonzales D. por su orientación y siempre bien dirigidos consejos a lo largo del trabajo de investigación, al Dr. (c) Juan Pablo Cárdenas quienes me apoyaron y fueron los pilares de este humilde pero sacrificado trabajo de memoria de pregrado, me brindaron ayuda en la redacción de los resultados y discusión de los mismos ambas personas del hermano país de Chile. Y al artífice de la idea Dr. Rodrigo Giacaman, Odontólogo con sus comentarios acertados acerca de la investigación.

A mi madre, Carmen por brindarme todo el apoyo necesario para seguir adelante, y sobre todo por inculcar valores y consejos en mi formación.

A la Dra. Blga. Delia Sánchez de CERPER S.A. por su constante apoyo moral para terminar la presente tesis.

Gracias a esos grandes amigos del CEGENP-UNPRG, personas tan especial, que compartimos carpetas en los cursos de Bioinformática que organizamos, Sinceramente gracias.

Y en especial gracias a ti cariño Maribel Z. por tu paciencia, comprensión y por ayudarme en los momentos más estresantes del trabajo.

Mi más sincera y profunda gratitud a todos. Espero no olvidarme de nadie.

# CONTENIDO

## ABSTRACT

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS
- III. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 3.1 Material
    - 3.1.1 Muestras
  - 3.2 Métodos
    - 3.2.1 Tipo de estudio
    - 3.2.2 Metodología
      - 3.2.2.1 Caracterización de la información genómica mediante categorización en la Base de datos de COGs (*Clusters of Orthologous Groups*) y análisis comparativo mediante Mauve (Primera Fase).
      - 3.2.2.2 Identificación de rutas metabólicas específicas mediante KEEG entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36 (Segunda Fase).
      - 3.2.2.3 Descripción de un modelo de vía de señalización celular entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36 (Tercera Fase).
      - 3.2.2.4 Realización de comparaciones de proteínas importantes en la competencia (Cuarta Fase).
    - 3.2.3 Análisis de los datos.
- IV. RESULTADOS
  - 4.1 Comparación genómica de las categorías funcionales COGs, análisis comparativo y identificación de rutas metabólicas específicas mediante KEEG.
  - 4.2 Identificación de rutas metabólicas específicas mediante KEEG entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36.
  - 4.3 Descripción y reconstrucción del sistema de *Quórum sensing* implicado en la transformación genética.
  - 4.4 Comparación de proteínas importantes en la competencia entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36.
- V. DISCUSIÓN
- VI. CONCLUSIONES
- VII. RECOMENDACIONES
- VIII. GLOSARIO
- IX. RESUMEN
- X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- XI. ANEXOS

## Abstract

Tooth decay is one of the most common diseases in humans and affects the quality of life in people of all ages. Moreover, it demands high resources of health services. In order to reduce tooth decay, a better understanding of the pathogenic role of microorganisms in dental diseases is needed. Studies have revealed the organisms who colonize the oral cavity and how they coexist. *S. sanguinis* is a primary colonizer in the oral cavity and produce quantities of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) which inhibit the growth of *S. mutans*. In the other hand, *S. mutans* produces antimicrobial peptides (mutacins) which appear to play a role in the competition against *S. sanguinis*. The aim of this research was to predict the metabolic model of competition and coexistence between *S. sanguinis* SK36 and *S. mutans* UA159 in the dental biofilm. Two genomes were analyzed by bioinformatics tools. Our results demonstrate that the competition and the coexistence is not only for the production of  $H_2O_2$  in *S. sanguinis*, but their genome encodes several proteins as glutathione peroxidase, V-ATPase enzyme complex, proteins relates in the quorum sensing system and PrtS (serine protease), which could give them several advantages. However, the *S. mutans* genome has a complex group of bacteriocins (mutacins). We founded seven, previously unreported, possible mutacins. As we described, that could be the unusuals ecological advantages in each specie to survive in the stressful and fluctuating dental biofilm environment. The model “*in silico*” about competition and coexistence between *S. sanguinis* SK36 and *S. mutans* UA159 has intended to create an useful framework to start an experimental research in the validation process.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Comparación de las secuencias de proteínas Com involucradas en la formación del sistema de *Quórum sensing* de *S. sanguinis* y *S. mutans*, caracterizados molecularmente en *S. pneumoniae* D39.

**Tabla 2.** Comparación de la similitud del sistema de ATPasas-F presentes en ambas especies.

**Tabla 3.** Sistema de ATPasas F y V presentes en ambos genomas.

**Tabla 4.** Número de genes regulados por la proteína CcpA entre *S. sanguinis* y *S. mutans*, según Regprecise.

**Tabla 5.** Alineamiento de las secuencias de proteínas serin proteasas en el género *Streptococcus sp.* mediante Matcher v.6.3.1.

**Tabla 6.** Análisis de localización celular de sgc y PrtS mediante CELLO, PSORTb y SignalP.

**Tabla 7.** Posibles mutacinas con motivo -GG- ubicadas mediante software Artemis en el genoma de *S. mutans* UA159.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Ensayo *in vitro* de la competencia y coexistencia de *S. sanguinis* y *S. mutans* en el biofilm (biopelícula) dental.

**Figura 02.** Bloques colineares locales (LCBs) entre dos secuencias cromosómicas de *S. mutans* y *S. sanguinis*.

**Figura 03.** Las categorías funcionales COGs entre *S. mutans* y *S. sanguinis*.

**Figura 04.** Predicción del mapa del metabolismo global que comparten *S. sanguinis* y *S. mutans*.

**Figura 05.** Reconstrucción del mapa del metabolismo del piruvato entre *S. mutans* y *S. sanguinis*, mediante análisis de sus genomas.

**Figura 06.** Comparación de la vía de utilización del glutatión entre *S. sanguinis* y *S. mutans*.

**Figura 07.** Alineamiento múltiple y alineamiento local de glutatión peroxidasa EC 1.11.1.9.

**Figura 08.** Análisis filogenético de la enzima glutatión peroxidasa de *S. sanguinis* con respecto a otros organismos.

**Figura 09.** Histograma del análisis comparativo de las secuencias de proteínas Com involucradas en el sistema de *Quórum sensing* entre *S. sanguinis* y *S. mutans*.

**Figura 10.** Modelo propuesto para la transformación genética mediada por el sistema de *Quórum sensing* en *S. sanguinis* y *S. mutans*.

**Figura 11.** Organización genómica propuesta para los operón *unc* y *atp* de *S. sanguinis* y *S. mutans*.

**Figura 12.** Organización genómica propuesta para el posible operón *ntp* de *S. sanguinis* SK36.

**Figura 13.** El alineamiento múltiple de secuencia (MSA) de la proteína CcpA en especies del género *Streptococcus*.

**Figura 14.** Comparación de las vías metabólicas reguladas por CcpA en *S. mutans* y *S. sanguinis*.

**Figura 15.** Alineamiento múltiple de secuencia (MSA) incompleto de posibles bacteriocinas (mutacinas) de *S. mutans* UA159.

**Figura 16.** Esquema del predictivo Modelo de coexistencia en *S. mutans* y *S. sanguinis*.

## LISTA DE ANEXOS

### Anexo 01:

**Tabla 08.** Tabla general de proteínas analizadas en el presente estudio, con significancia estadística a través del parámetro e-value y % de identidad.

**Tabla 09.** Numero y porcentaje de genes para las categorías funcionales COGs de *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159.

### Anexo 02:

**Figura 16.** Diagrama de Veen. Comparación total de genes (ORFs) entre *S. sanguinis* SK36 que presenta 1960 ORFs y *S. mutans* UA159 presenta 2253 ORFs

### Anexo 03:

**Figura 17.** Flujograma del trabajo bioinformático (análisis *in silico*) el cual comprende cuatro fases detalladas en la metodología del trabajo.

### Anexo 04:

Lista de web de Base de datos (BD) y softwares utilizados en el estudio bioinformático.

## I. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa, transmisible e inducida por la placa bacteriana, asociada a un huésped susceptible portador de una flora odontopatógena que produce ácidos, a través de la fermentación de carbohidratos que provocan la disolución y destrucción localizada de los tejidos duros del diente (Loesche, 1982). Además la caries es una de las enfermedades más comunes en el ser humano, aunque rara vez amenaza la vida, es un problema que afecta la calidad de vida de las personas (Sathyanarayanan *et al.*, 2002) y demanda altos recursos de parte de los proveedores de servicios de salud. Esta enfermedad se asocia con la presencia de un biofilm bacteriano dependiente de azúcares fermentables de la dieta (Vadiakas, 2008). Con el fin de disminuir la prevalencia de caries, una mejor comprensión del papel patogénico de los microorganismos en las enfermedades dentales es necesario (Marsh, 2003).

Se plantea en estudios que la caries dental la padecen aproximadamente el 96% en el mundo y un 99% de la población de América Latina (Rodríguez *et al.*, 2006). La condición de Salud Bucal en el Perú, atraviesa una situación crítica debido a la alta prevalencia de enfermedades odontoestomatológicas, así tenemos que la prevalencia de caries dental es 95%, enfermedad periodontal 85%, constituyendo un problema de salud pública. Además en lo que se refiere a caries dental el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPOd), a los 12 años es de aproximadamente 6 CPOd, ubicándose según la OPS en un país en estado de emergencia (MINSA, 2012).

Asimismo, las interacciones cooperativas entre especies probablemente juegan un rol importante en el desarrollo del biofilm dental, las interacciones antagonistas entre diferentes especies pueden ser equitativamente importantes dadas las condiciones de la cavidad oral (Kreth *et al.*, 2005).

Estudios previos realizados permiten conocer los organismos involucrados en la coexistencia y el antagonismo dentro de los cuales están los estreptococos orales, como *S. sanguinis*, que produce cantidades de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) que inhiben el crecimiento de *S. mutans* (Kreth *et al.*, 2008). Sin embargo, la evidencia molecular es aun débil y requiere de mayor investigación. Aunque *S. sanguinis* también produce péptidos antimicrobianos (sanguicina) (Deng *et al.*, 2004), estos péptidos no podrían jugar un papel en la competencia contra *S. mutans*. Desde el punto de vista clínico, el predominio de *S. sanguinis* sobre *S. mutans* en el biofilm dental podría asociarse con una menor prevalencia de caries en niños (Ge *et al.*, 2008).

De otro modo, la Bioinformática es impulsada por avances en tecnologías de alto rendimiento biológico y cada vez mayores números de genomas secuenciados. La construcción de modelos *in silico* a escala genómica proporciona poderosas herramientas para investigar una amplia gama de sistemas biológicos. Esta permite el análisis masivo y riguroso de procesos celulares realizados por un microorganismo, generando predicciones sobre posibles eventos moleculares con un mayor grado de confiabilidad que lo proveniente por la intuición. Incluso, permiten predecir genes esenciales en todo el genoma de un organismo favoreciendo la selección de aquellas moléculas que puedan ser blancos de la acción de fármacos (Roberts *et al.*, 2007), para posteriormente ser evaluadas experimentalmente *in vitro* e *in vivo* (Fatumo *et al.*, 2009).

El campo bioinformático se está tornando más amplio: de una docena de genomas secuenciados en el año 1997 aumentaban a noventa genomas secuenciados cinco años mas tarde y se siguen aún secuenciando, aumentando esta cifra exponencialmente. Es por eso que la comparación de múltiples genomas (genómica comparativa) se ha convertido en un tema frontera de investigación (Chain *et al.*, 2003). Como consecuencia de los avances tecnológicos destinados al campo de la genómica se ha logrado proyectar a la comunidad científica, la secuenciación de genomas de cualquier organismo de interés científico o económico. Hoy en día existen más de 4 122 genomas bacterianos completamente secuenciados y 16 255 proyectos más en curso (GOLD: <http://.genomesonline.org>, actualizado a Agosto del 2013).

Estrategias basadas en genómica comparativa de múltiples cromosomas de especies filogenéticamente distintas pueden proporcionar huellas acerca de las presión selectiva que regulan a determinado grupos de genes que pueden ofrecer respuestas sobre los mecanismos de la evolución, variación fenotípica y del material genético externo a través de la transferencia genética horizontal. Esto ha dado buenos resultados en comparaciones entre especies estrechamente relacionadas, como el ser humano y el chimpancé (Nobrega & Pennacchio, 2003).

Hasta la fecha, no se presentan estudios a nivel bioinformático para entender las rutas metabólicas y vías de señalización que involucran las interacciones moleculares de coexistencia y antagonismo en el biofilm. Por lo tanto, es necesario analizar y dilucidar la genómica de la bacteria comensal del biofilm dental *S. sanguinis* SK36 y de la bacteria sindicada como la más cariogénica *S. mutans* UA159. Según lo expuesto, se formuló el siguiente problema ¿Cuál es modelo metabólico general de la competencia y coexistencia entre *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159 en el biofilm dental? Para solucionar este problema se plantearon los siguientes objetivos:

Caracterizar la información obtenida del genoma de *Streptococcus sanguinis* SK36 y *Streptococcus mutans* UA159 para los genes expresados según categorización existente, mediante la base de datos bioinformáticos COGs.

Identificar las rutas metabólicas específicas de *Streptococcus sanguinis* SK36 y *Streptococcus mutans* UA159, mediante KEGG.

Describir el modelo de vía de señalización entre *Streptococcus sanguinis* SK36 y *Streptococcus mutans* UA159 en base a información bibliográfica y experimental con el servidor Pubmed con microorganismos relacionados filogenéticamente.

Comparar proteínas significativas involucradas en la competencia y coexistencia en el genoma de *Streptococcus sanguinis* SK36 y *Streptococcus mutans* UA159.

En el presente estudio se usó el área de genómica comparativa que presenta alto impacto biotecnológico y provee de nuevos datos para incrementar conocimientos acerca de las interacciones moleculares dilucidando las rutas metabólicas y vías de señalización que involucran las interacciones moleculares de antagonismo de *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Microorganismos Orales.

La cavidad bucal es uno de los hábitats microbianos más heterogéneos y complejos del cuerpo (Madigan *et al.*, 2003). La microbiota oral funciona como una parte de la defensa del huésped, actuando como una barrera al promover competencia por los nutrientes esenciales y crear condiciones desfavorables para los organismos exógenos que pueden ser patógenos para el huésped. Se han encontrado más de 700 taxones en la cavidad oral, sin embargo no están presentes en la misma boca (Aas *et al.*, 2005). La composición también varía en los diferentes sitios de la cavidad oral, por ejemplo una gran carga bacteriana mucho más diversa esta en el dorso de la lengua. La mayoría de estos microbios son inofensivos y están en equilibrio, pero bajo ciertas condiciones algunos pueden causar infecciones bucales como la caries o enfermedad periodontal (Sakamoto *et al.*, 2005).

Se han realizado estudios de análisis molecular asociado a la microflora bacteriana que causa la caries por el método ARNr 16S. Se demostró que la dentina cariada está dominada por bacterias grampositivas, en particular los géneros *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Streptococcus*. Además se identificaron 95 taxones, de los cuales los predominantes en el análisis molecular fueron *S. mutans* (16%), *Lactobacillus gasseri/jhonsonii* (13%) y *Lactobacillus rhamnosus* (8%). (Munson *et al.*, 2004). *Streptococcus* es un género dominante en la cavidad oral humana, representando aproximadamente el 20% de las más de 700 especies de bacterias que han sido identificadas y alrededor del 80% de los colonizadores iniciales del biofilm (Rosan y Lamont, 2000).

Los estreptococos están presentes en todas las placas dentales, se incrementan en número cuando se desarrollan procesos cariosos y se encuentran más frecuentemente sobre superficies cariadas que sobre superficies libres de caries (MacDonald, 1962). El género *Streptococcus* reagrupa especies muy diferentes por sus características quimiotaxonómicas y por su poder patógeno: **Grupo S. mutans:** *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* y *S. downei*; **Grupo S. anginosus:** *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*; **Grupo S. mitis:** *S. sanguinis*, *S. parasanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, y *S. cirsta*; **Grupo S. salivarius:** *S. salivarius* y *S. vestibularis* (Mouton *et al.*, 1995).

Así mismo tenemos estreptococos orales que son compatibles con la salud (por ejemplo, las especies *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguinis*) y patógenos (por ejemplo, el cariogénico del grupo, *Streptococcus mutans*). Debido a que los estreptococos tienen similitud en los requerimientos metabólicos, han desarrollado estrategias de defensa que conducen al antagonismo entre especies (conocido como interferencia bacteriana) (Kreth *et al.*, 2008).

## **2.2 *Streptococcus mutans.***

El nombre de *Streptococcus mutans* fue dado en 1924 por J. K. Clarke a los estreptococos que se habían aislado en lesiones cariosas, pero no fue hasta los años sesenta del siglo XX que se le prestó mayor atención. Se realizaron estudios, sobre la transmisión de la caries en animales donde, se observó la analogía entre los estreptococos cariogénicos y el *S. mutans* identificado de J.K. Clarke. En la actualidad de las 7 especies del grupo de *Streptococcus mutans* se distinguen 2 humanas: *S. mutans* y *S. sobrinus* y 5 animales: *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* y *S. downei* (Fitzgerald *et al.*, 1960). *S. mutans* da nombre a un grupo de siete especies estrechamente relacionadas referidas colectivamente como *Streptococcus mutans*.

Los hábitats principales de *S. mutans* son la boca, la faringe y el intestino (Loesche, 1986), *S. mutans* es el principal agente patógeno asociado a la caries dental, vive casi exclusivamente en los biofilm densamente poblados que se forman en la superficie del diente. Grandes cantidades de ácido orgánico son producidas por las células embebidas en el biofilm, creando un medio ácido que erosiona la superficie del diente y por lo tanto provoca la caries. Por lo general, la aparición de *S. mutans* en las cavidades de los dientes es seguido por la caries después de 6-24 meses (Mayooran *et al.*, 2000). *S. mutans* presenta habilidades como aciduricidad/acidogenicidad, la formación de biofilms, la competencia natural y la producción de bacteriocinas (mutacinas) son cruciales para su virulencia (Banas, 2004; Kuramitsu, 1993).

En consecuencia, la virulencia de *S. mutans* es causado por su capacidad para formar biofilm, producir ácidos orgánicos y tolerar el estrés ambiental, particularmente bajo condiciones de bajo pH (Ajdic *et al.*, 2002). En el año 2002 fue secuenciado el genoma completo de *S. mutans* cepa UA159 el cual está organizado en un cromosoma circular de 2, 030 936 pares de bases. El promedio de contenido GC es de 36.82 % similar a otros organismos con bajos índices de GC. Además posee 62 tRNAs y cinco operones rRNA. Las secuencias codificantes de proteínas representan el 85,66 % del genoma y está organizado en 1963 ORFs, con promedio de longitud de genes de 885 bases. La clave de su estrategia de supervivencia radica en el metabolismo de carbohidratos, el cual es capaz de metabolizar una amplia gama de azúcares. Presenta genes para el transporte y metabolismo de glucosa, sacarosa, lactosa, galactosa, manosa, celobiosa, trehalosa, rafinosa, ribulosa, maltosa/maltodextrina,  $\beta$ -glucosida, melobiosa, isomaltosácaridos y posiblemente sorbosa (Ajdic *et al.*, 2002).

### 2.3 *Streptococcus sanguinis*.

*S. sanguinis* es un colonizador primario de la cavidad bucal humana y uno de los microorganismos que colonizan los dientes (Kuramitsu *et al.*, 2007). Es una bacteria grampositiva perteneciente al grupo de los *Streptococcus viridans* (Kreth *et al.*, 2008). *S. sanguinis* sirve como una cuerda donde pueden fijarse otros microorganismos orales que colonizan la superficie del diente formando la placa dental (Yamaguchi *et al.*, 2006).

La patogenicidad de este organismo no se limita a las infecciones orales, sino que se extiende y provoca el peligro de la vida, presentándose en una enfermedad endovascular llamada endocarditis. La endocarditis es una infección grave de las válvulas o el revestimiento del corazón (Turner *et al.*, 2009). Al igual que los otros estreptococos orales, esta bacteria produce  $\alpha$ -hemólisis en agar sangre, una característica vinculada a la capacidad de los *Streptococcus viridans* para oxidar la hemoglobina de los eritrocitos por la secreción de  $H_2O_2$  (Barnard *et al.*, 1996).

Los avances en el campo de la bioinformática han acelerado el progreso de la investigación médica en la lucha contra enfermedades. Es así que hace unos años el genoma de *S. sanguinis* fue secuenciado (Xu *et al.*, 2007). El genoma de *S. sanguinis* presenta las siguientes características generales: está organizado en un cromosoma circular de 2, 388 435 pares de bases, el promedio de G+C es de 43,40% el cual es alto comparado con otros genomas de especies de estreptococos (35,62 a 39,72 %). Además el genoma contiene genes que codifican 2 274 proteínas predichas, de las cuales el 89% exhiben similitud significativa a proteínas de otros organismos y el 22% son proteínas hipotéticamente conservadas.

## 2.4 Elementos involucrados en la competencia dentro de la biopelícula dental.

La placa dental, donde se encuentran cientos de especies bacterianas, es el mejor ejemplo de un biofilm natural en el cuerpo humano. Pese a que se han realizado muchos estudios en la formación de biofilm monoespecíficos, estos no representan verdaderamente la dinámica del biofilm oral encontrado en la boca. El biofilm oral muestra una intensa competencia así como sinergismo metabólico entre varias las especies microbianas constituyentes. Nobbs *et al.*, (2009) indica que *S. mutans*, *S. gordonii* y otros estreptococos orales forman fácilmente el biofilm de una especie en el laboratorio y en una variedad de superficies.

La formación de biofilm depende de actividades de loci genéticos múltiples. Es así, que se han estudiado mutaciones en genes que codifican la formación de biofilm y los componentes del sistema *quorum sensing*, Por ejemplo, mutaciones en los genes *comCDE* (Li *et al.*, 2002); TCSS, *vicRK* (Senadheera *et al.*, 2005) y genes que codifican para permeasas de iones metálicos (Rolerson *et al.*, 2006) pueden afectar a *S. mutans* en la formación del biofilm. Asimismo, la formación óptima del biofilm por parte de *S. gordonii* y *S. sanguinis* también requiere de múltiples productos génicos incluyendo sortasas (Nobbs *et al.*, 2007) además de las proteínas involucrados con el metabolismo de  $\beta$ -glucósido y el control de catabolitos (Kilic *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2003), biosíntesis de nucleótidos (Ge *et al.*, 2008), el estrés oxidativo (Kuboniwa, *et al.*, 2006), y detección ambiental y señalización (Gilmore *et al.*, 2003).

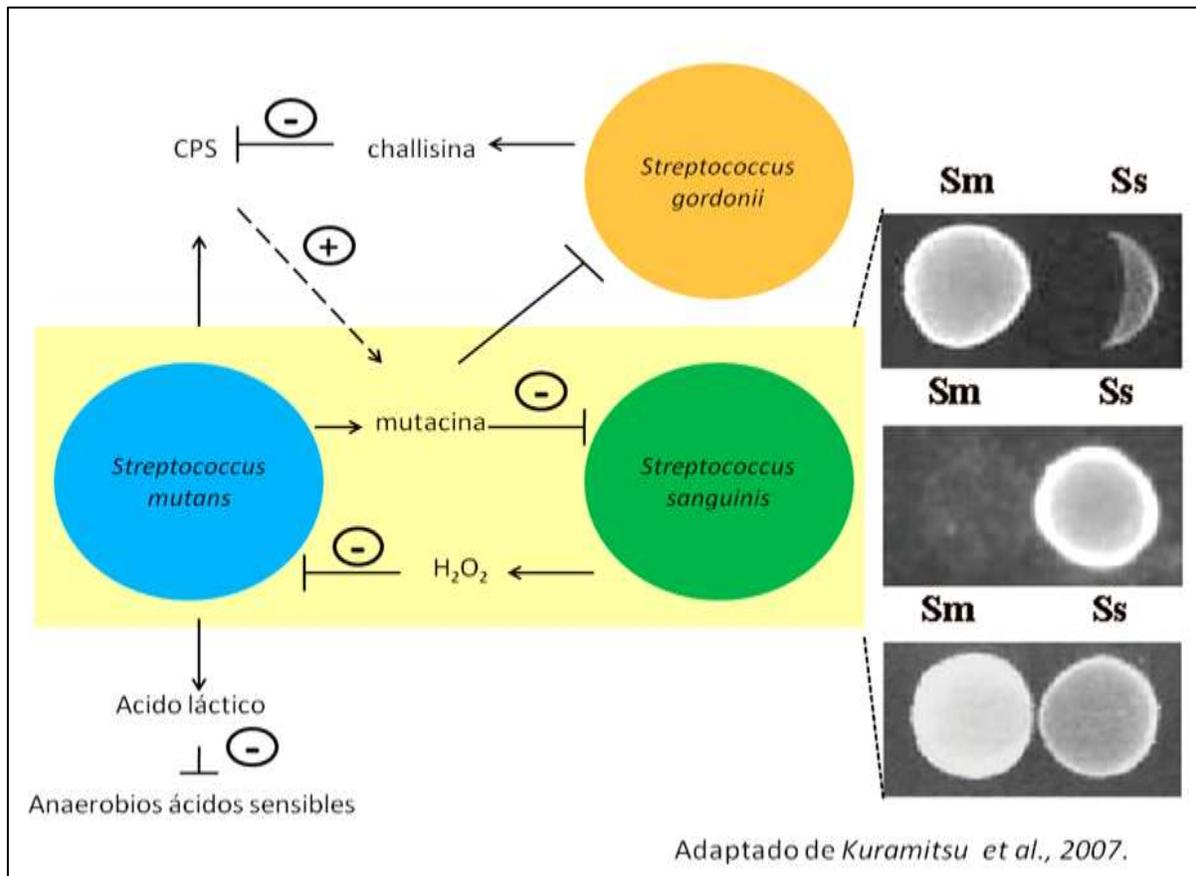
Uehara *et al.*, (2006) estableció sustancias que regulan interacciones entre especies. Es así que la producción de  $H_2O_2$  está relacionada con la competencia y la convivencia dentro de las comunidades microbianas como los biofilms orales. Los estreptococos son capaces de producir sustancias inhibitoras tales como  $H_2O_2$  para reducir el crecimiento de microorganismos co-residentes por ejemplo, *S. sanguinis* puede producir  $H_2O_2$ , que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Díaz *et al.*, (2006) y después Kreth *et al.*, (2008) indican que los competidores como los estreptococos del

grupo Mitis colonizan en un principio el biofilm dental, crecen más rápido, y puede generar  $H_2O_2$ , que es un potente inhibidor del crecimiento del grupo *S. mutans*.

Becker *et al.*, (2002) realizó estudios *in vivo* enfocados en *S. sanguinis* donde se considera inofensivo en la cavidad oral. En individuos sanos se presenta un número significativamente elevado en la placa dental, respecto a los individuos con caries que prácticamente no tienen niveles detectables de *S. sanguinis*. En efecto, *S. sanguinis* y el cariogénico *S. mutans* son mutuamente antagónicas, el crecimiento de *S. mutans* se retrasa cuando *S. sanguinis* está presente en gran abundancia en la cavidad bucal en seres humanos (Caufield *et al.*, 2000).

Por otro lado Woodruff *et al.*, (1998) indican que las células bacterianas competentes tratan de generar sustancias para inhibir el crecimiento de otras y colonizar ambientes con fluctuaciones como el biofilm oral. *S. mutans*, junto con muchas otras bacterias grampositivas producen pequeños péptidos antibacterianos llamadas bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por *S. mutans*, llamadas mutacinas, pueden proporcionar la fuerza selectiva necesaria para la colonización inicial o sostenimiento en la placa dental de ese patógeno.

En condiciones donde las células tienen la energía suficiente para competir, pero no suficiente alimento para un crecimiento óptimo se activa la producción de mutacina (por parte de *S. mutans*) o  $H_2O_2$  (por parte de *S. sanguinis*). Desde el punto de vista económico de la célula, la síntesis de mutacina y  $H_2O_2$  se relaciona con el equilibrio entre el costo y beneficio. La biosíntesis de mutacinas I y IV es un proceso energéticamente costoso. Para mutacina I, por lo menos 11 productos genéticos son necesarios de sintetizar para producir una molécula de mutacina funcional (Qi *et al.*, 2001), y para mutacina IV, se requieren por lo menos cinco productos génicos. Estas estrategias bien reguladas son necesarias para la supervivencia y perpetuación de la especie en una comunidad multiespecífica en condiciones naturales como es la cavidad oral donde los ciclos de abundancia, hambruna y fluctuaciones de pH son habituales y ocurren repetidamente durante el día (Kuramitsu *et al.*, 2007).



**Figura 01. Ensayo *in vitro* de la competencia y coexistencia de *S. sanguinis* y *S. mutans* en el biofilm (biopelícula) dental.** Estudios realizado por Kuramitsu et al., (2007). Donde indica el antagonismo de ambas especies por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o por mutacinas. Además *S. gordonii* produce una proteína chollisin que inactiva los péptidos estimulantes de la competencia (CPS). *S. mutans* produce altas cantidades de ácido producto de su metabolismo fermentativo inhibiendo el crecimiento de especies sensibles al ácido. En la parte de la derecha se muestran las inhibiciones: superior (*S. mutans* sobre *S. sanguinis*), medio (*S. sanguinis* sobre *S. mutans*) y inferior (coexistencia entre *S. mutans* y *S. sanguinis*).

Kreth *et al.*, (2008) demostró en ensayos *in vitro* que la disponibilidad de oxígeno y de glucosa sustancialmente influyen en la competición entre especies de estreptococos. *S. mutans* por ejemplo, es capaz de producir mutacinas inhibitoras del crecimiento, independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Kreth *et al.*, 2005). Socransky *et al.*, (2002) indican que la tensión de oxígeno puede disminuir durante la formación del biofilm, debido a la limitación de la difusión y al rápido consumo de este. Con relación al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un componente antimicrobiano, no se produce cuando las células crecen en condiciones anaeróbicas. Pero la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas podría ser suficiente para funcionar en la competencia entre especies.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en importantes rutas metabólicas, en la potencial virulencia patogénica y la competencia interespecifica. Se han estudiado algunos genes como el gen *spxB* involucrado en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ramos-Montañez *et al.*, 2008), pero su regulación y su relación con otros genes supuestamente implicados en la misma vía aún no están claras.

La proteína anotada como *spxB* es una descarboxilasa que cataliza la conversión de piruvato, fosfato inorgánico (Pi) y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y acetil fosfato, que actúa como un dador de grupos fosforilo de alta energía (Ramos-Montañez *et al.*, 2008) Piruvato+O<sub>2</sub>+Pi → CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Acetil~P.

Zheng *et al.*, (2011) demostró la importancia del regulador de CcpA (Proteína A de control del catabolito) en el control de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la muerte celular dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la liberación de ADN extracelular. Además indica que CcpA reprime la expresión de *spx*. En mutantes ( $\Delta$ CcpA) de *S. sanguinis* se observó mayor expresión de la proteína Spx, por lo tanto elevada producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La ventaja ecológica de esta inusual regulación dependiente de CcpA podría haber conducido a incrementar el número de *S. sanguinis* en comparación con *S. gordonii* en el biofilm dental y podría ser una de las razones por la que *S. sanguinis* es capaz de competir exitosamente con los patógenos antagonistas tales como *S. mutans* en el biofilm oral.

Kreth *et al.*, (2009) demuestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuye en la liberación de ADN en *S. sanguinis* y *S. gordonii*, esto posiblemente apoye la formación de biofilms orales y podría facilitar el intercambio de material genético entre las cepas transformantes. La captación de ADN extracelular es otro mecanismo de competencia que está presente en los estreptococos. Podría ser un estado fisiológico transitorio durante el cual el ADN que ha sido tomado del medio ambiente, conduce a la transferencia horizontal de genes, a la plasticidad genómica y a la adquisición de nuevos rasgos genéticos (Morrison, 1997).

## **2.5 Sistema de Quórum sénsing.**

La comunicación entre célula-célula es una actividad fundamental realizada por muchos tipos de células. Anteriormente, las bacterias fueron consideradas como células individuales que buscaban nutrientes y se multiplican independientemente. Sin embargo estudios nos muestran que las bacterias son capaces de tener actividades coordinadas como el *Quórum sénsing* (QS). Muchas bacterias, incluyendo los estreptococos son conocidos por regular diversos procesos fisiológicos a través de este mecanismo. En bacterias grampositivas, el sistema de QS consiste de tres componentes, un péptido señal y un sistema regulador de dos componentes, el cual presenta un sensor histidina quinasa anclado a la membrana y una proteína reguladora de respuesta (Kleerebezem *et al.*, 1997).

El QS regula la virulencia en muchos patógenos humanos (Bassler, 1999). Ejemplos de funciones del QS en bacterias grampositivas incluyen la formación de biofilms (Li *et al.*, 2002a), el desarrollo de competencias genéticas (Havarstein *et al.*, 1995), respuesta de tolerancia al ácido y producción de péptidos antimicrobianos (Kleerebezem & Quadri., 2001). Los detalles moleculares del desarrollo de competencias, incluyendo la identificación de genes que regulan las competencias, se analizaron inicialmente en *Streptococcus pneumoniae* (Johnsborg & Havarstein, 2009).

Se sabe que el sistema QS, regula numerosas actividades fisiológicas en *S. gordonii*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* (Cvitkovitch, 2001) y la inducción de factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* (Kleerebezem & Quadri., 2001). El sistema QS puede influenciar en la formación de la estructura del biofilm en bacterias grampositivas (Loo *et al.*, 2000). Un mutante defectivo del biofilm en *S. gordonii*, presenta un transposón insertado en el gen *comD*, que codifica una proteína sensor histidina quinasa requerida para la competencia genética. Esto podría dar a entender que la formación del biofilm por *S. gordonii* involucra la comunicación célula- célula a través del Sistema QS. La inactivación de algunos genes *comCDE*, que codifican el sistema QS resulta en la formación de un biofilm anormal (Li *et al.*, 2002b).

Se realizaron estudios en *S. mutans* demostrando que la formación de biofilm, tolerancia a ácido y la transformación genética son mediados por el sistema de QS (Cvitkovitch *et al.*, 2003). El sistema QS, para poder activarse depende de péptidos estimulantes de la competencia (CSP). Los CSP extracelulares (ambientales) son detectados por el sistema de dos componentes (TCSS), y los CSP a concentración umbral activan la respuesta celular (Pestova *et al.*, 1996). En *S. pneumoniae*, el desarrollo de la competencia requiere de la producción de CSP, estos son codificados por genes *comC* cuyos productos son secretados al medio extracelular por proteínas de transporte ComAB (Hui & Morrison, 1991).

Se ha reconocido que la señal de QS en *S. pneumoniae* es iniciada, a través de la actividad de un modulador global de la transcripción, el gen *comX* el cual es un factor sigma alternativo durante el desarrollo de la competencia genética (Lee y Morrison, 1999). La transcripción del gen *comX*, es regulado por *comE* regulador de respuesta del sistema de QS (Ween *et al.*, 1999). El factor sigma ComX, inicia la transcripción de operones específicos de la competencia involucrados en la recombinación y captación de ADN por reconocimiento de la caja *com*, que presenta la secuencia consenso (TACGAATA) en estas regiones promotoras (Lee & Morrison, 1999).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. MATERIAL**

##### **3.1.1 Muestras**

El estudio se realizó mediante el análisis del genoma de la cepa *Streptococcus mutans UA159*, aislado clínico del serotipo C, de la Universidad de Alabama, Birmingham, EE. UU. con Número de accesión: AE014133 en GenBank y el genoma de la cepa *Streptococcus sanguinis SK36*, de Virginia Commonwealth University con RefSeq NC\_009009.1. Sus secuencias genómicas se encuentran depositadas en GenBank y son de libre acceso en **NCBI** (National Center for Biotechnology Information). Disponible en: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **3.2. MÉTODO**

##### **3.2.1 Tipo de estudio.**

El presente informe es una investigación descriptiva, según el método de reconstrucción metabólica propuesto por Valdés *et al.*, 2003 con modificaciones por el autor.

##### **3.2.2. Metodología**

La capacitación para realizar el presente trabajo se logró mediante el manejo de bases de datos y software en bioinformática específicamente en genómica y del análisis de los datos arrojados con ayuda de libros de la especialidad. El trabajo consistió en ir de los detalles genómicos (generales) a los detalles específicos con proteínas significativas indicadoras de competencia.

### **3.2.2.1 Caracterización de la información genómica mediante categorización en la Base de datos de COGs (*Clusters of Orthologous Groups*) y análisis comparativo mediante Mauve.**

La primera estrategia (**primera fase**) consistió en realizar un análisis comparativo de los dos genomas basados en la secuencias genómicas depositadas en GenBank para lo cual se obtuvo la versión más reciente. En este paso se utilizó los software **MAUVE v. 2.3.1** y **Artemis v.13.2.0**, los cuales presentan una excelente interfase gráfica para buscar regiones conservadas (sintenia) y no conservadas (específicas) presentes en ambos microorganismos. En la caracterización del contexto genómico, se encontraron ortólogos en otros microorganismos cercanos filogenéticamente, esto se obtuvo a través de **Microbes Online** (Dehal *et al.*, 2009). Caracterización mediante la Base de datos (BD) **COGs** (*Clusters of Orthologous Groups* o conjuntos de grupos de ortólogos). Cada COGs se define como el grupo de tres o más proteínas, estos han sido desarrollados mediante la comparación de todos contra todos de secuencias de proteínas codificadas en genomas completos secuenciados, usando el programa BLAST. Los COGs se obtuvieron de la BD **MicroScope, MaGe** (2006).

### **3.2.2.2 Identificación de rutas metabólicas específicas mediante KEEG entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36.**

La segunda estrategia (**segunda fase**) consistió en hacer un borrador de la reconstrucción metabólica de las rutas más relevantes y el mapa global de las vías para el desarrollo de la competencia en *Streptococcus mutans* UA159 y *Streptococcus sanguinis* SK36, basado en la anotación genómica de ambas especies. Para esto, se necesitó la versión más reciente disponible de la anotación de ambos organismos en GenBank, ya que la calidad y fiabilidad de la anotación genómica es crucial para la calidad de la reconstrucción metabólica *in silico*.

A partir de la anotación se identificaron las reacciones metabólicas catalizadas por los productos de genes de *S. mutans* y *S. sanguinis*. Estas se conectaron usando los números de la Enzyme Commission (EC) y bases de datos de reacciones bioquímicas como las bases de datos: **KEGG** (Kanehisa *et al.*, 2006), **MetaCyc** (Karp *et al.*, 2002) y **BRENDA** (Barthelmes *et al.*, 2007) obteniéndose una lista de metabolismos candidatos. Además se utilizó el servidor **MicroScope** (2006). Para el refinamiento y validación del modelo metabólico general se usó el servidor web: **PubMed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) el cual provee de información experimental en *S. sanguinis* y *S. mutans*, además de otros microorganismos cercanos filogenéticamente.

### **3.2.2.3 Descripción de un modelo de vía de señalización celular entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36.**

En este paso se utilizó el software **Artemis v.13.2.0**, **Microbes Online**, **BlastP** y **Pubmed**. Se procedió analizar en el genoma mediante Artemis todas las posibles proteínas anotadas que participen en procesos de señalización con ayuda de Pubmed, estas fueron contrastadas mediante BlastP (Altschul *et al.*, 1997), para obtener los mejores alineamientos con altas puntuación y se escogió el alineamiento con el mejor E-value. Además se verificó el contexto genético mediante Microbes online. Las secuencias fueron analizadas en **Microscope** (<https://genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index>). **(Tercera fase)**

### 3.2.2.4 Realización de comparación de proteínas importantes en la competencia y coexistencia.

Se encontró proteínas de interés en competencia con posible función conocida que presentaron altos porcentajes de identidad y score. Estas fueron de interés en la investigación y se caracterizaron usando herramientas disponibles en Base de datos en la Web: (**cuarta fase**).

a.- Relaciones de similitud de la estructura primaria **Matcher v.6.3.1** ([www.ebi.ac.uk/Tools/psa/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/)), predicciones de estructura secundaria **PSI-PRED** (Jones, 1999), predicción de proteínas transmembrana **TMHMM v.2.0** (Krogh *et al.*, 2001), predicción de motivos **Prosite** (Hofmann *et al.*, 1999), predicción de dominios **Pfam** (Bateman *et al.*, 2002), **MEME** (Bailey & Elkan 1994).y sitios de localización de proteínas **PSORT** (Nakai *et al.*, 1999) predicción de la localización subcelular **CELLO v. 2.5** (Yu *et al.*, 2006) péptido señal **SignalP 4.0** (Petersen *et al.*, 2011), además **TblasN** y **BlastP** (Altschul *et al.*, 1997).

b.- Se encontraron posibles proteínas ancestrales. Para ello se utilizó análisis filogenético: Las secuencias de aminoácidos de las proteínas se alinearon con MSA usando el programa **Clustal X v. 2.0** (Thompson *et al.*, 1997), cuya información permitió el diseño del árbol filogenético. Para este propósito se usó el método de máxima parsimonia aplicando el modelo de matrix JTT (Jones *et al.*, 1992), considerando 1000 bootstrap como réplicas y omisión de gaps. Este análisis se realizó usando el programa **MEGA v. 5.05**. (Tamura *et al.*, 2011).

El análisis filogenético se realizó específicamente de la enzima glutatión peroxidasa de distintas bacterias. Los códigos de GenBank de las glutatión peroxidasa descargadas de NCBI son:

<b>A001</b>	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655	(NP_416225.1)
<b>B002</b>	<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36	(YP_001035467.1)
<b>C003</b>	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	(NP_344850.1)
<b>D004</b>	<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	(YP_064268.1)
<b>E005</b>	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	(NP_967328.1)

<b>F006</b>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis str. 168	(NP_390073.1)
<b>G007</b>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	(NP_717176.1)
<b>H008</b>	<i>Streptococcus mitis</i> B6	(YP_003446873.1)
<b>I009</b>	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	(YP_001450057.1)
<b>J010</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> rm11-1a1.	(NP_012303.1)

En la parte de los anexos se encuentra una figura que muestra las fases del trabajo realizado (Flujograma: Anexo 04, Figura 17).

### 3.2.3. Análisis de los datos.

Después de la búsqueda de secuencia de proteínas mediante BlastP, y secuencia de nucleótidos Blastn en la base de datos no redundante (**NCBI**), cada alineamiento fue analizado para medir su significancia estadística. De los alineamientos resultantes llamados pares de alta puntuación (*High Score Pairs* o **HSPs**). Se reportaron sólo los pares de alineamientos que obtuvieron una probabilidad menor al parámetro **E-value**.

El e-value fue usado para la obtención de genes o proteínas homólogas (alta identidad) en organismos cercanos evolutivamente. E-value llamado valor esperado de corte, el cual permite definir qué pares alineamientos buenos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor es el valor del E-value, más significativo es un alineamiento. El análisis fue riguroso y se utilizó un *e-value*  $< 10^{-5}$  o 0.00005.

Además las comparaciones de secuencias mediante alineamiento local fueron medidas con el parámetro porcentaje de identidad (P.I.). Para que ser significantes este valor debe ser  $>30\%$ . Un valor de  $E = 0.0$  significa  $1e^{-179}$ . En anexos se deja una lista de los principales sitios web utilizados en el presente trabajo de investigación.

Los resultados arrojados por las BDs y software fueron incorporados a una base de datos en Microsoft Office Excel 2007 y el diseño de figuras en Microsoft Power Point 2007, para su correspondiente descripción. Se trabajó con un equipo procesador Core I5.

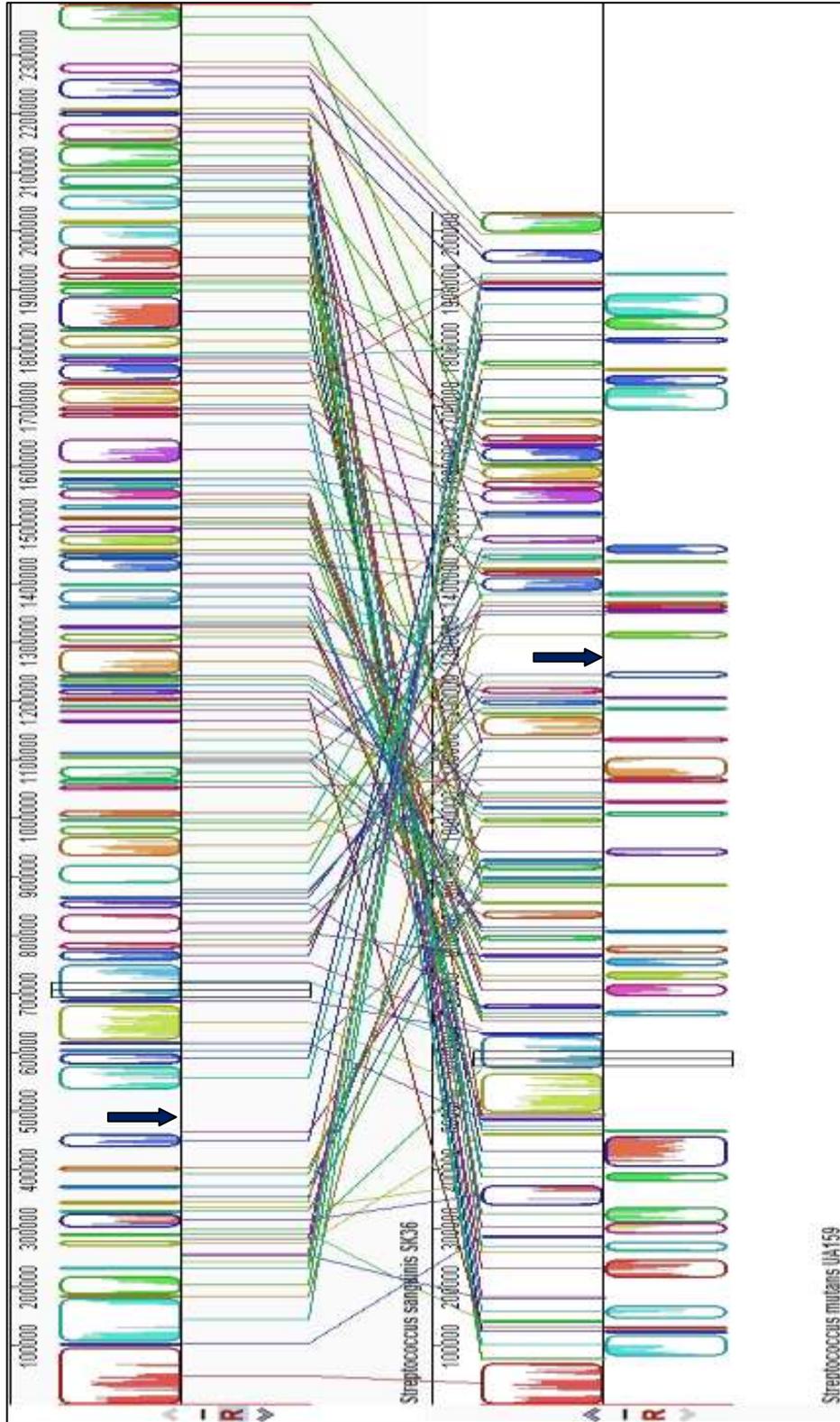
## VI. RESULTADOS

Los resultados del presente estudio fueron divididos en 4 secciones para el mejor detalle: 4.1 Comparación genómica de las categorías funcionales COGs, análisis comparativo 4.2 Identificación de rutas metabólicas específicas mediante KEEG entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36. 4.3 Descripción y reconstrucción del sistema de *Quórum sénsing* implicado en la transformación genética. 4.4 Realización de comparación de proteínas importantes en la competencia y coexistencia.

### 4.1 COMPARACIÓN GENÓMICA Y LAS CATEGORIAS FUNCIONALES COGs.

Como primera estrategia se necesitaba conocer cómo es la conservación general de los genes en los genomas de *S. mutans* UA159 (en adelante *S. mutans*) y *S. sanguinis* SK36 (en adelante *S. sanguinis*). Se analizó mediante MAUVE (Figura 02) las dos secuencias genómicas, se encontró 137 Bloques Colineares Locales (LCBs) con un peso mínimo de 1495pb. Los (LCB) representan puntos de referencia (homología/ regiones conservadas compartidas) en los cromosomas analizados. Los LCBs que se encuentran en la misma ubicación pero en posiciones superior e inferior unidos por líneas verticales y oblicuas representan el complemento inverso de la secuencia de ADN de referencia.

Los 137 LCBs con líneas de conexión (sintenia) entre ambos genomas identifican la ubicación de cada LCB ortólogo en los dos genomas. Regiones con zonas blancas o sin unión en el LCB indican la presencia de secuencias (ORFs) específicos de cada especie o con escasa similitud en las secuencias. Además se observó que la cadena cromosómica comparada entre ambas especies muestran reordenamientos de amplias extensiones de grupos de ORFs, excepto en las posiciones de las 100 000 pb que coinciden con el origen de replicación del ADN en ambos genomas se muestran grupos de secuencias con ortólogos conservados.



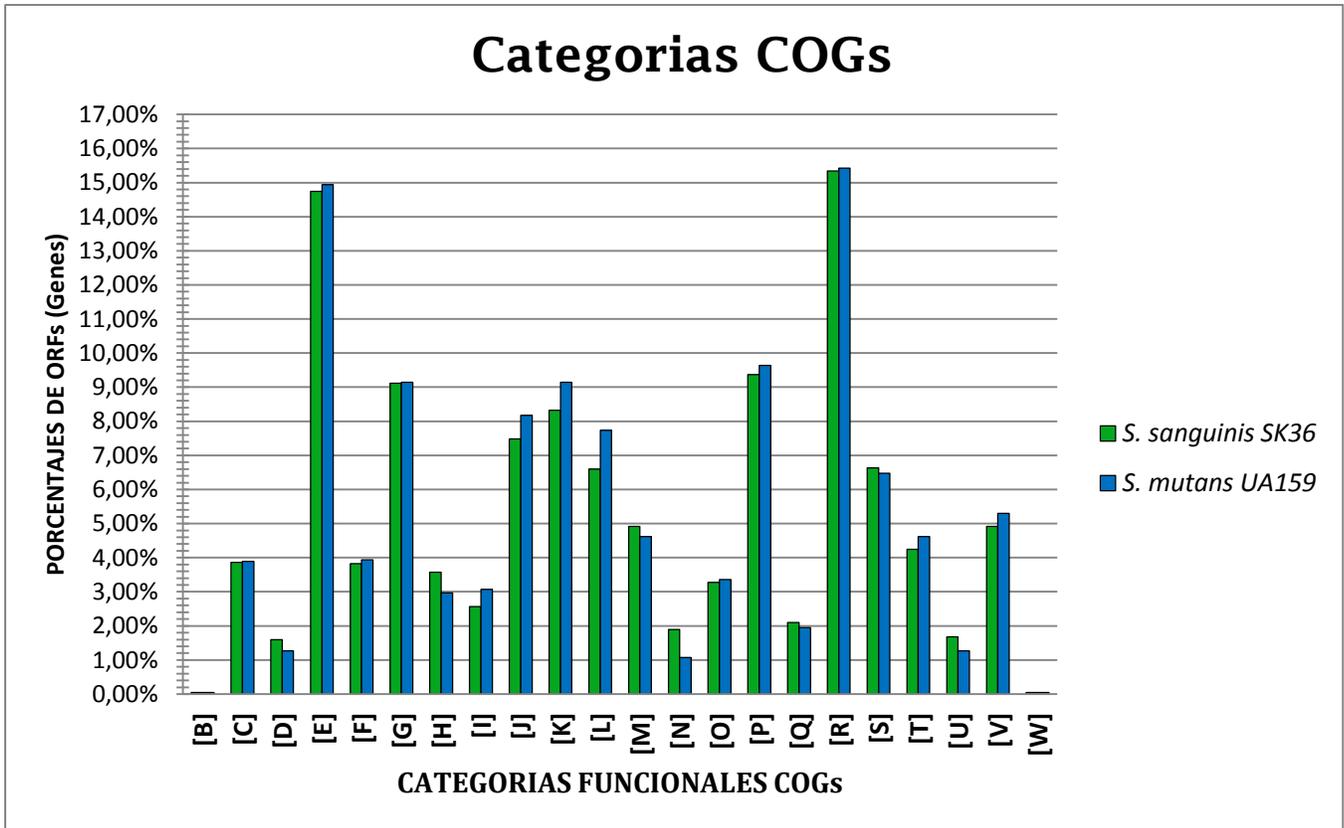
**Figura 02. Bloques colineares locales (LCBs) entre dos secuencias cromosómicas de *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36.** Representación de 137 LCBs entre las secuencias cromosómicas de ADN de las dos especies, el análisis fue realizado mediante el software MAUVE 2.3.1 con un peso mínimo de 1495pb. Se muestra alto reordenamiento, inserciones entre ambos genomas.

Se analizó las zonas marcadas (flechas) en *S. sanguinis* y se encontró un grupo de ORFs que codifican para enzimas de biosíntesis de la vitamina B<sub>12</sub>, transportadores ABC y proteínas hipotéticas. (Dato no mostrado). En el lugar marcado con una flecha en el genoma de *S. mutans* se encontró ORFs que le dan resistencia a bacitracina, transposasas, permeasas y proteínas hipotéticas.

El análisis genómico entre ambas especies, consistió en clasificar los genes anotados que codifican marcos abiertos de lectura (ORFs) de *S. mutans* y *S. sanguinis*, a través de las categorías COGs (*Clusters of Orthologous Groups*). Los COGs están divididos en 22 categorías, se elaboró la tabla 09 (Anexo 01) con los números de ORFs de cada categoría funcional y se realizó un histograma (Figura 03) para comparar las categorías COGs entre *S. sanguinis* y *S. mutans*.

Para *S. sanguinis* el 78,03% de los ORFs se clasifican al menos en un COG (1857 ORFs/2380) y en *S. mutans* un 80.39 % de los ORFs se clasifican al menos en un COG (1652 ORFs/2055) (<https://genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index>), actualizado a agosto, 2013. Los ORFs de cada categoría de ambos microorganismos se muestran en porcentajes para cada una de las 22 categorías funcionales. Se detallan (Figura 03) cada una de las 22 categorías funcionales de la célula microbiana.

De acuerdo con el análisis realizado de las categorías COGs (*Clusters of Orthologous Groups*). Se analizaron las categorías más relevantes con respecto al número de genes involucrados. *S. sanguinis* y *S. mutans* presentan proteínas con relación a la categoría [C], de producción y conversión de energía, por encima del 3.00% de sus ORFs. Con respecto a la categoría [G] Metabolismo y transporte de carbohidratos, presentan un porcentaje similar cercano al 9.00% de sus ORFs. Con respecto a la categoría [E] metabolismo y transporte de aminoácidos ambas especies presentan por encima del 14.30% de sus ORFs que codifican para proteínas asociadas a esta categoría y respecto a la categoría [P] Metabolismo y transporte de iones inorgánicos presentan ORFs por encima del 9.00%.



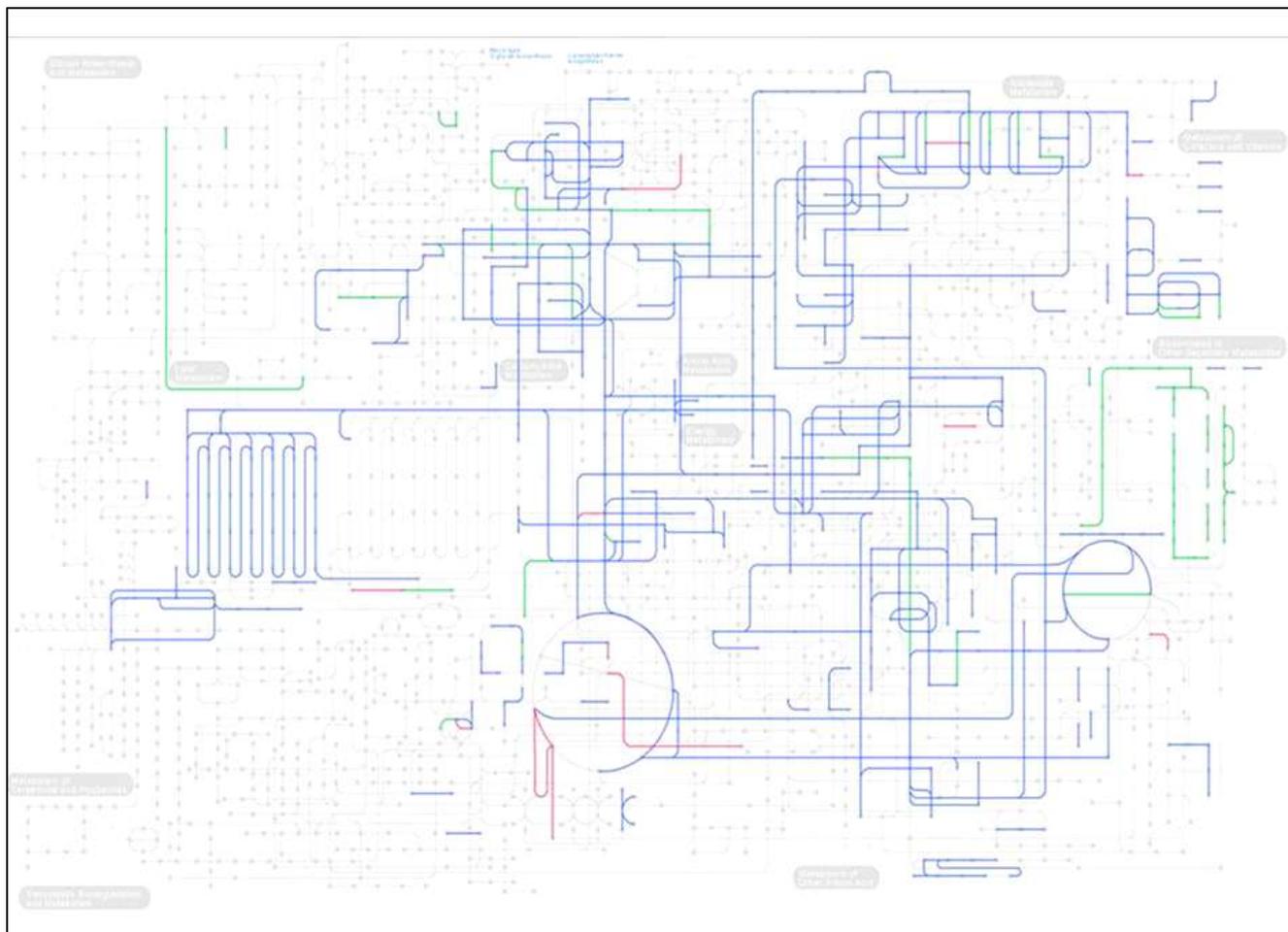
**Figura 03.** Las categorías funcionales COGs entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36. Fueron analizadas 22 categorías con respecto al porcentaje en el número de marcos abiertos de lectura (ORFs) de los genes en cada categoría, que son las siguientes: **[B]** Estructura y dinámica de la cromatina; **[C]** Producción y conversión de energía; **[D]** Control del ciclo celular, división celular; **[E]** Metabolismo y transporte de aminoácidos; **[F]** Metabolismo y transporte de nucleótidos; **[G]** Metabolismo y transporte de Carbohidratos; **[H]** Metabolismo y transporte de Coenzimas; **[I]** Metabolismo y transporte de lípidos; **[J]** Traducción, biogénesis y estructura ribosomal; **[K]** Transcripción; **[L]** Replicación, recombinación y reparación; **[M]** Biogénesis de la envoltura, membrana y pared; **[N]** Motilidad celular; **[O]** Modificación postraduccional y chaperonas; **[P]** Metabolismo y transporte de iones inorgánicos; **[Q]** Biosíntesis de metabolitos secundarios; **[R]** Predicción solo de función general; **[S]** Función desconocida **[T]** Mecanismos de Transducción de señales; **[U]** Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; **[V]** Mecanismos de defensa; **[W]** Estructura extracelulares. El análisis fue realizado en el servidor COGs y Microscope (<https://genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index>).

## 4.2 COMPARACIÓN DE LOS MAPAS DE LAS VÍAS METABÓLICAS ENTRE *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36, según KEEG y MetaCyc.

La segunda estrategia realizó un mapa modelo del metabolismo global en ambos microorganismos en base a sus posibles proteínas. Se analizaron 183 vías que están presentes en el Dominio Bacteria, como las vías metabólicas y vías de señalización a partir de los mapas de referencia en KEEG y MetaCyc. Además con el soporte de revisión bibliográfica en PubMed (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), se obtuvieron diferencias entre el metabolismo de *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36, para luego realizar el análisis de las vías más relevantes.

Las diferencias encontradas a partir del análisis de los mapas referenciales (Figura 04) se describen para *S. sanguinis*, el cual presenta vías únicas. En lo que corresponde a metabolismo de aminoácidos, se encontró que *S. sanguinis* presenta genes candidatos para degradación de histidina. Otra vía hallada única en *S. sanguinis*, fue la biosíntesis de esfingolípidos, junto con la síntesis de glicerolípidos. Se encontraron además las rutas del metabolismo de nucleótidos y metabolismo de porfirinas.

En *S. mutans*, el análisis (Figura 04), no encontró rutas específicas ya sean vías completas o incompletas con sus grupos de genes. Sin embargo se encontraron enzimas exclusivas de esta especie en color rojo, posiblemente confiriéndole alguna ventaja frente a su competidor *S. sanguinis*. Se describen los genes que codifican las enzimas exclusivas de *S. mutans* son: *lpk*, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (EC 2.7.1.148), *dxs*, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (EC 2.2.1.7) presente en la biosíntesis de terpenoides; *SacB*, beta-D-fructosiltransferasa (EC 2.4.1.10), que forma parte del metabolismo de la sacarosa y el almidón; *pycB*, oxaloacetato descarboxilasa, subunidad alfa (EC 4.1.1.3); *Smu264*, agmatina deiminasa (EC 3.5.3.12), que pertenecen al metabolismo de prolina y arginina; *Smu2127*, succinato semialdehído deshidrogenasa, perteneciente al metabolismo de glutamato, aspartato y alanina; *pckA*, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) (EC 4.1.1.49), presente en la glucólisis/gluconeogénesis, ciclo de Krebs, metabolismo del piruvato; *Smu139*, oxalato descarboxilasa (EC 4.1.1.2) presente en el metabolismo de glioxilato. Glutamato sintasa smu.365, smu.366 degradación de la glutamina.



**Figura 04. Predicción del mapa del metabolismo global que comparten *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159.** Las líneas de color azul son las vías metabólicas que comparten ambos microorganismos, las líneas verde son exclusivas de *S. sanguinis* y las líneas rojas fueron exclusivas de *S. mutans* en todo el esquema están representadas las enzimas y productos intermedios de las reacciones, el trabajo se realizó mediante el servidor KEGG (<http://genome.jp/kegg/>).

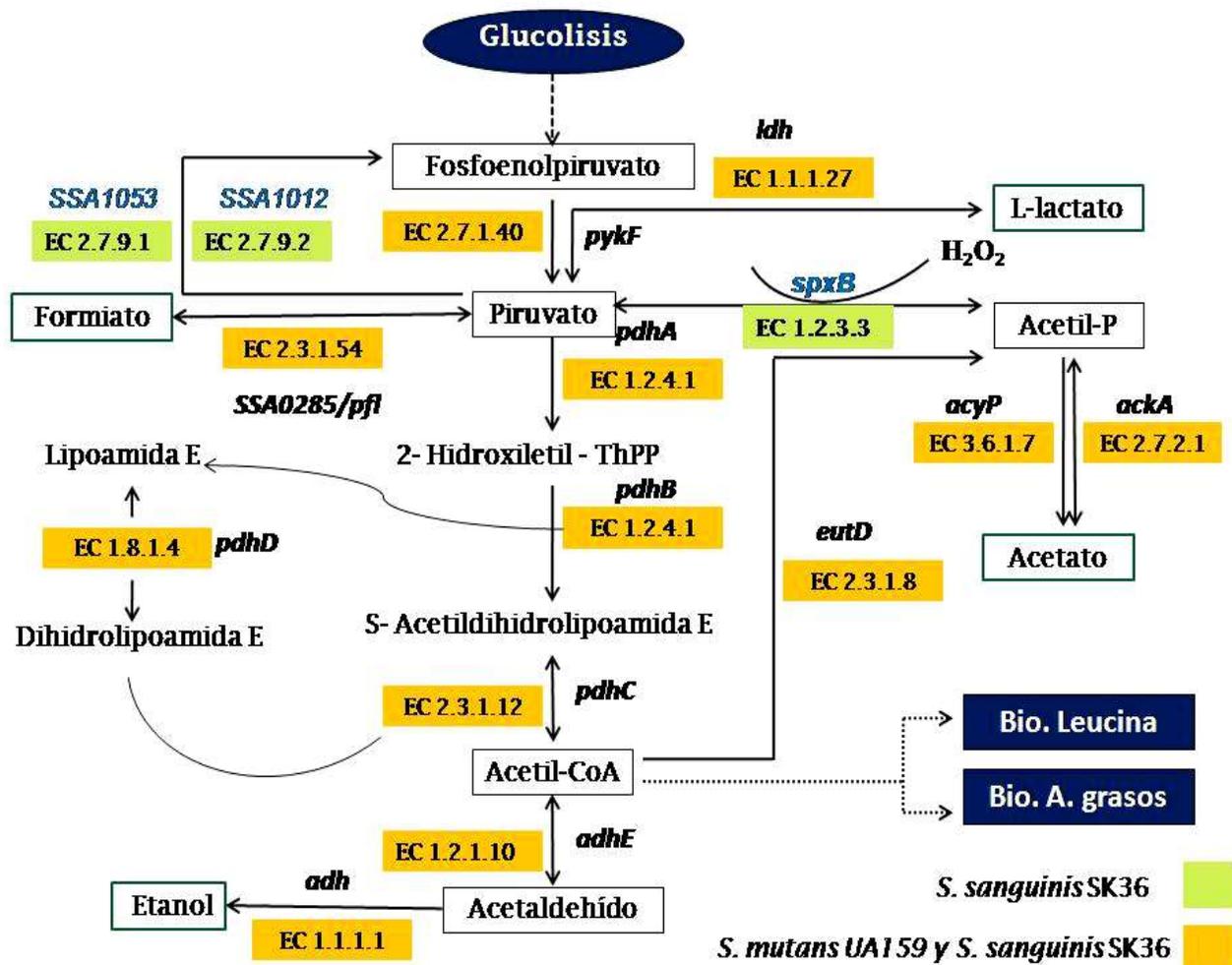
#### 4.2.1 Reconstrucción y comparación de la vía del metabolismo del piruvato.

La vía del piruvato es una vía central para la fermentación de azúcares en los estreptococos. La vía fue reconstruida en base a sus genomas, mediante Pubmed, KEGG y MetaCyc se realizó la reconstrucción del metabolismo del piruvato para ambas especies (Figura 05). El metabolismo del piruvato es conservado en *S. sanguinis* y *S. mutans*, estos presentan ortólogos con altos porcentajes de identidad, representado una de sus principales vías para la degradación y formación de energía metabólica (ATP). Sin embargo se presentan enzimas adicionales en *S. sanguinis* que le podrían conferir una ventaja en la competencia con respecto a *S. mutans* en la biopelícula dental.

En ambas especies se presentan combinaciones similares de genes que codifican enzimas involucradas en esta vía. Hay diferencias en tres enzimas únicas en *S. sanguinis* SK36, como piruvato fosfato diquinasa (EC 2.7.9.1; *SSA1053*), fosfoenolpiruvato sintasa (EC 2.7.9.2; *SSA1012*) y la piruvato oxidasa (EC 1.2.3.3; *SSA0391*), las cuales no están presentes en *S. mutans*.

El piruvato proveniente de la vía glucolítica puede ser degradado, por medio de la fermentación acidoláctica como se ha descrito para *Streptococcus spp.* (Madigan *et al.*, 2003). La fermentación acidoláctica, se divide en a) fermentación homoláctica a lactato y b) fermentación heteroláctica produciendo etanol, formiato, lactato y acetato. Estos procesos ocurren a través de una serie de reacciones en ambas especies cuyo punto de partida es la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al ADP, formándose ATP y piruvato a través de la enzima piruvato quinasa (EC 2.7.1.40).

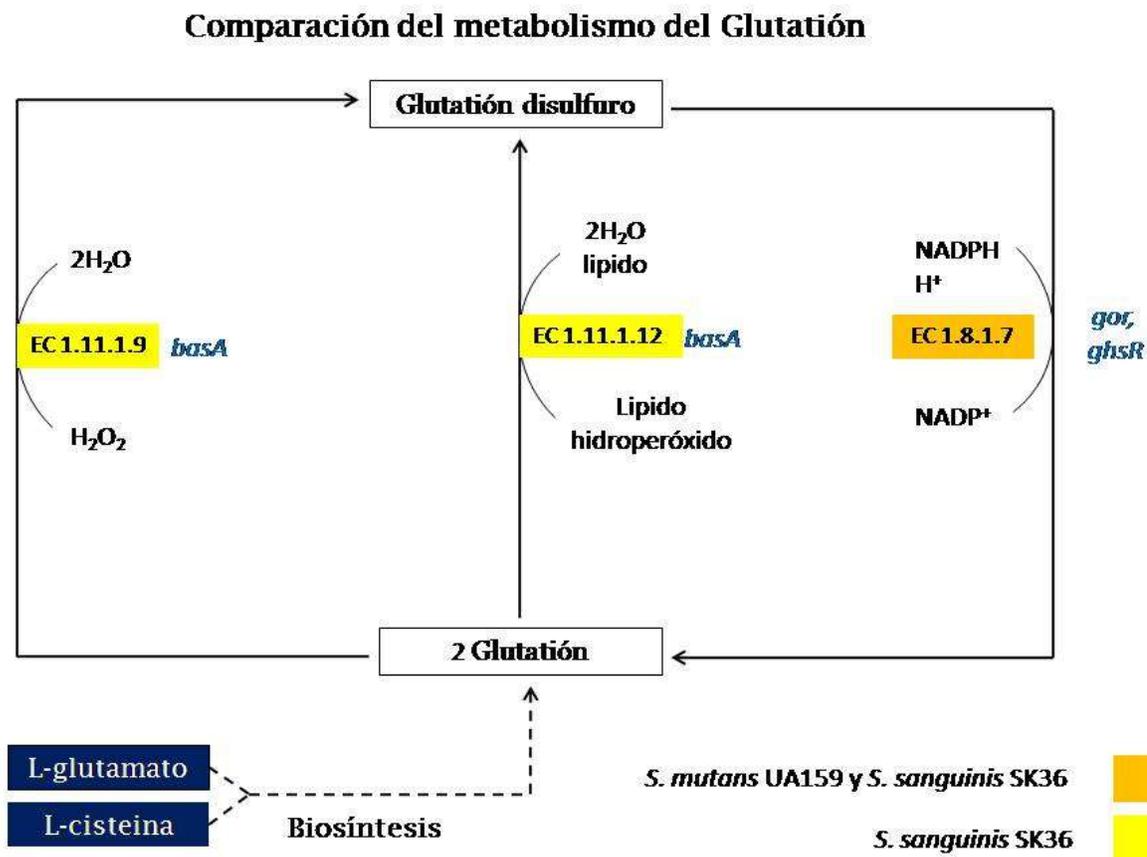
Se encontró diferencias con respecto a algunos productos génicos en esta vía del metabolismo de piruvato. Radican en que sólo en *S. sanguinis* el piruvato puede transformarse nuevamente en fosfoenolpiruvato a través de dos enzimas piruvato fosfato diquinasa (EC 2.7.9.1; *SSA1053*) y fosfoenolpiruvato sintasa (EC 2.7.9.2; *SSA1012*). Además *S. sanguinis* posee otra reacción alternativa catalizada por la piruvato oxidasa (EC 1.2.3.3, *SSA0391*) que acelera la transformación de piruvato en acetilfosfato, liberándose  $H_2O_2$  (Figura 05).



**Figura 05.** Reconstrucción del mapa del metabolismo del piruvato entre *S. mutans* UA159 y *S. sanguinis* SK36, mediante análisis de sus genomas. Se muestra los productos intermedios y enzimas codificados por los genes presentes en el genoma de *S. sanguinis* (verde) y *S. mutans* (naranja). La reacción catalizada por la piruvato oxidasa (EC 1.2.3.3, (SSA0391)) la cual produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le proporcionaría una ventaja competitiva a *S. sanguinis* contra *S. mutans*, en la biopelícula dental en condiciones aeróbicas (O<sub>2</sub>). **Ldh** (Lactato deshidrogenasa), **pykF** (Piruvato quinasa), **spxB** (Piruvato oxidasa), **pdhA** (piruvato dehidrogenasa E1 subunidad alfa), **pdhC** (piruvato dehidrogenasa E2), **pdhD** (Dihidrolipoamida deshidrogenasa), **adhE** (acetaldehído deshidrogenasa), **adh** (alcohol deshidrogenasa), **acyP** (acilfosfatasa), **ackA** (acetato quinasa), **pfl** (piruvato formato liasa), **eutD** (fosfato acetil transferasa). Para este análisis se usaron servidores KEGG, BRENDA y MetaCyc.

#### 4.2.2 Predicción de la vía de utilización del glutatión en ambas especies.

Se elaboró un mapa comparativo de la vía de utilización del glutatión (Figura 06), para *S. mutans* y *S. sanguinis*. La biosíntesis del glutatión proviene del metabolismo del glutamato y cisteína. Ambos organismos comparten una enzima anotada como glutatión reductasa (EC 1.8.1.7) codificada por el gen *gor* en *S. sanguinis* y *ghsR* en *S. mutans*. En *S. sanguinis* también se encontró una posible enzima glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9; EC 1.11.1.12; COG0386), codificada por el gen *basA* (SSA1523). Esta enzima se encuentra en la posición 1 532 207 – 1 532 680 del genoma de *S. sanguinis*, el producto del gen *basA* consta de 157 residuos de aa.



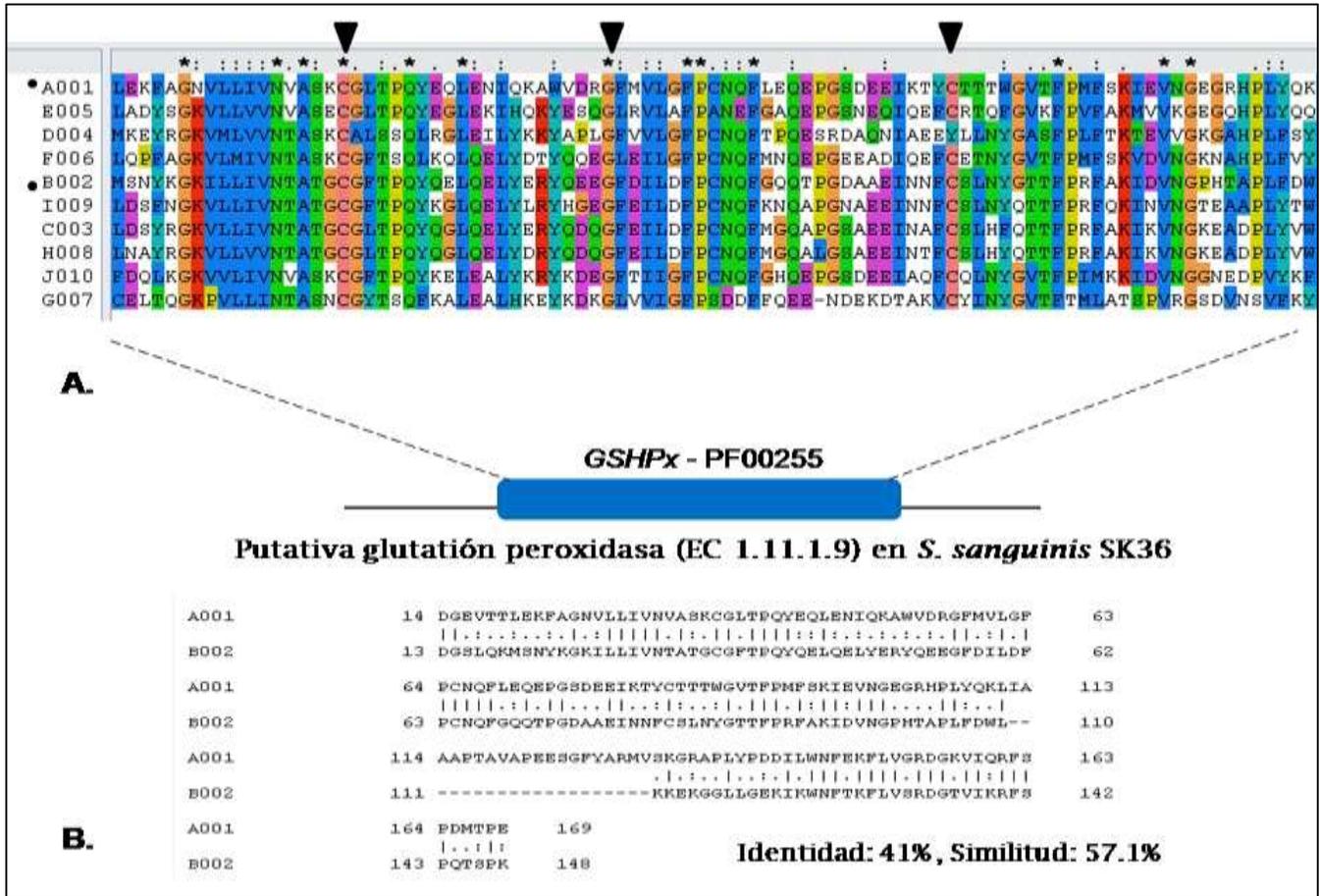
**Figura 06. Comparación de la vía de utilización del glutatión entre *S. sanguinis* y *S. mutans*.** Se muestra la presencia del gen *basA* (SSA1523) que codifica una posible glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9; EC 1.11.1.12) en *S. sanguinis* y la ausencia de esta enzima en *S. mutans*, sin embargo se presenta en ambas especies una posible enzima glutatión reductasa (EC 1.8.1.7). El análisis se realizó mediante los servidores MetaCyc y KEGG.

#### 4.2.2.1 Análisis de la posible enzima anotada como glutatión peroxidasa:

Se pretendió dilucidar si la secuencia de aminoácidos era conservada en los sitios catalíticos de la enzima. Por lo tanto se realizó alineamiento múltiple de secuencia (MSA) con microorganismos cercanos filogenéticamente que presentan la enzima glutatión peroxidasa y se haya caracterizado. Para realizar el análisis se extrajó 10 secuencias de glutatión peroxidasa de especies diferentes depositadas en GenBank, (ver Métodos, tercera fase. b).

Se encontró (Figura 7A) aminoácidos altamente conservados (cisteínas y glicinas) en posiciones del sitio activo de las enzimas del género *Streptococcus*. Además presenta el dominio GSHPx (PF00255) característico de glutatión peroxidasa. Para analizar la conservación de la enzima glutatión peroxidasa en organismos procariontes, se realizó un alineamiento local de las secuencias de *E. coli str. K-12 substr. MG1655* y *S. sanguinis SK36*, arrojando identidad de 41% y similitud de 57.1%. *E. coli* fue tomado debido que esta caracterizada su enzima y nos serviría como sustento experimental (Figura 7B).

El mismo procedimiento se ejecutó entre las secuencias de glutatión peroxidasa (GPXs) del eucariota *Saccharomyces cerevisiae* versus *S. sanguinis*, arrojando identidad de 50% y similitud de 66.5%. Ambos resultados muestran altos grados de conservación de la secuencia de esta enzima en organismos procariontes y eucariontes arrojando que los motivos estructurales son importantes para su función biológica y enzimática.

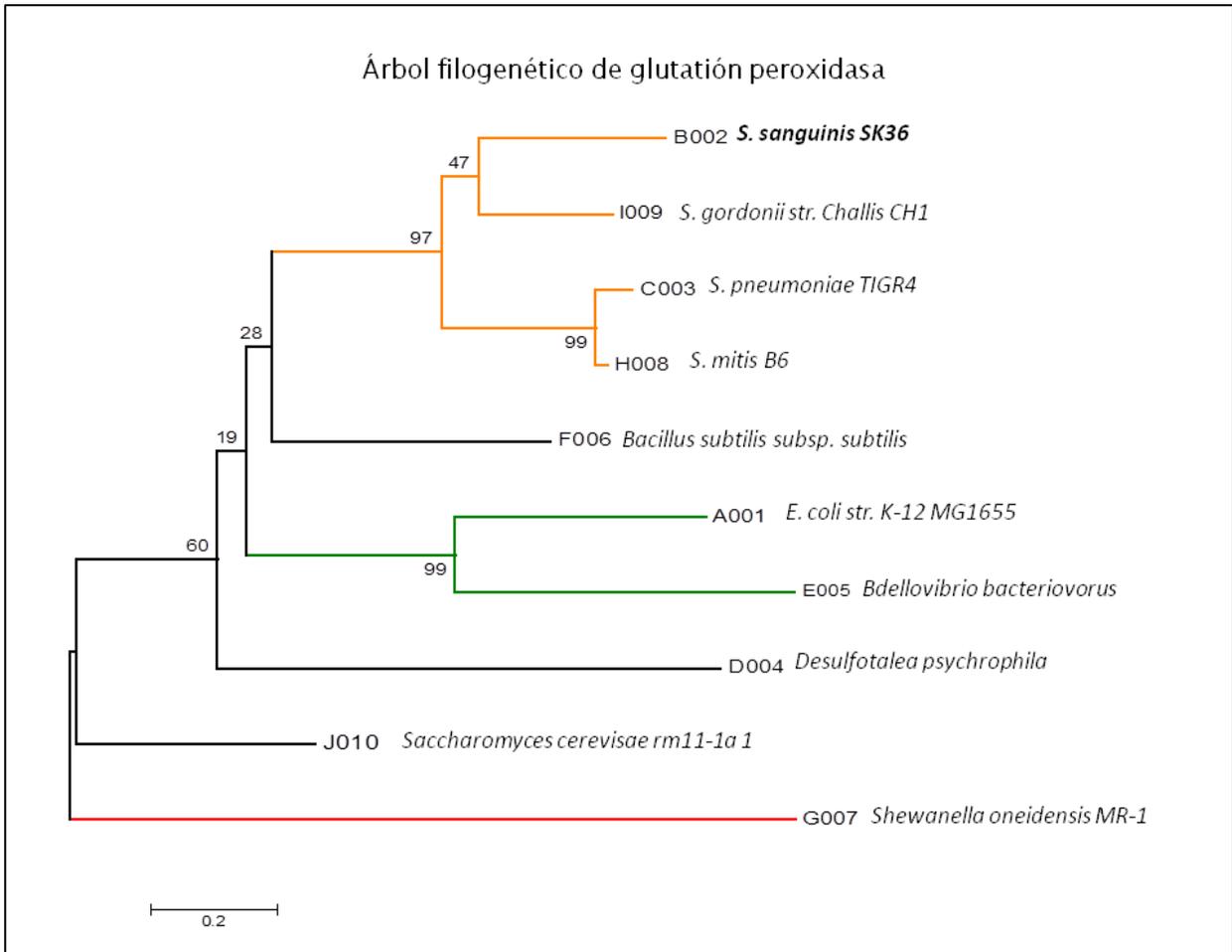


**Figura 07. Alineamiento múltiple y alineamiento local de glutatión peroxidasa EC 1.11.1.9.** (A) Alineamiento múltiple de glutatión peroxidasa de diferentes especies filogenéticamente cercanas, las especies de este análisis están codificadas (Ver Metodología), realizado mediante el software ClustalX v. 2. (B) Alineamiento local, de dos glutatión peroxidasa de *E. coli str. K-12 substr. MG1655* código **A001** y *S. sanguinis* SK36 **B002**.. Se usó Matcher v. 6.3.1. ([http:// ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_matcher/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/)).

#### 4.2.2.2 Análisis filogenético de las secuencias de glutatión peroxidasa:

Se realizó en análisis de cómo estaban relacionadas evolutivamente las secuencias de aminoácidos de enzimas glutatión peroxidasa de microorganismos cercanos filogenéticamente con respecto a *S. sanguinis* (B002), se usó como grupo externo el eucariota *S. cerevisiae* var.rm11-1a 1. El resultado obtenido fue un árbol filogenético (Figura 08), basado en el método de máxima verosimilitud, usando en el modelo matrix JTT. Se utilizaron 1000 bootstrap como réplicas, agrupando las secuencias en 6 grupos.

Los resultados (Figura 08) indican que las enzimas glutatión peroxidasa de *S. sanguinis* y *S. gordonii* (Challis) se ubican en una rama en la cual posiblemente comparten un ancestro común y además que divergieron hace poco tiempo. Se podría predecir que esta enzima es homóloga y posiblemente realicen la misma función con respecto a *S. gordonii*. En una rama aparecen las cuatro especies del género *Streptococcus* donde las ramas indican relación de la enzima con respecto a su carácter evolutivo dentro del grupo de Estreptococos mostrándose como un bloque aparte y formando un linaje que posiblemente divergió de un ancestro común con *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*. Algo interesante es que *Shewanella oneidensis* se ubica en una rama independiente, significa que la enzima de este organismo presenta alto grado de divergencia y posiblemente apareció antes que los demás organismos analizados durante el proceso evolutivo.



**Figura 08.** Análisis filogenético de la enzima glutatión peroxidasa de *S. sanguinis* con respecto a otros organismos que presentan la enzima. Se observó a *S. sanguinis*, dentro del grupo de los *Streptococcus*, alejado del grupo externo el eucariota *S. cerevisiae* -rm11-1a 1. Usamos 10 taxones para el análisis. El árbol fue generado usando MEGA versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). La escala representa el número de sustituciones de aminoácidos por sitio en la cadena peptídica.

### **4.3 DESCRIPCIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE QUÓRUM SENSING: Implicado en la transformación genética en *S. sanguinis* y *S. mutans*.**

#### **4.3.1 Análisis y reconstrucción de las proteínas de competencia Com componentes del Quórum sensing.**

Se analizó las proteínas Com involucradas en el sistema de (QS) entre *S. sanguinis* y *S. mutans* mediante alineamiento local con Matcher v. 6.3.1. Se usó los % de identidad y % de similitud para obtener datos. Los genes anotados fueron contrastados con sus ortólogos con la especie mas cercana filogenéticamente, *Streptococcus pneumoniae* cuyos productos génicos han sido corroborados experimentalmente.

Los resultados (Tabla 01 y Figura 09) indican que las proteínas codificadas por el operón *comCDE*, muestran mediano grado de conservación. La secuencia aa de la proteína *comC* es completamente diferente entre ambos microorganismos. *ComX*, presenta notable grado de conservación, esta proteína tiene como función unirse al ARN polimerasa.

Los genes del operón *comAB*, codifican proteínas con una alta conservación entre *S. mutans*, sin embargo *S. sanguinis* no presenta estos transportadores tipo ABC, esta función podría ser llevada a cabo por otro tipo de transportadores del tipo ABC. No se reconoció ninguna proteína anotada *ComA* y *ComB* en *S. sanguinis* que presente un ortólogo en *S. pneumoniae*. En *S. mutans* presenta la proteína *ComB* pero no presenta homólogos.

Respecto a los genes del operón *comYABCD*, codificantes de proteínas del locus Y en ambas especies, presentan un alto grado de conservación en las secuencias aminoacídicas. Además el operón *comEABC*, codifica proteínas con alta identidad, posiblemente presente dominios estructurales y funcionales conservados que son importantes para el sistema de transformación genética en ambos microorganismos.

**Tabla 01.** Comparación de las secuencias de proteínas de la competencia Com involucradas en la formación del sistema de *Quórum sensing* de *S. sanguinis* y *S. mutans*, caracterizados molecularmente en *S. pneumoniae* D39.

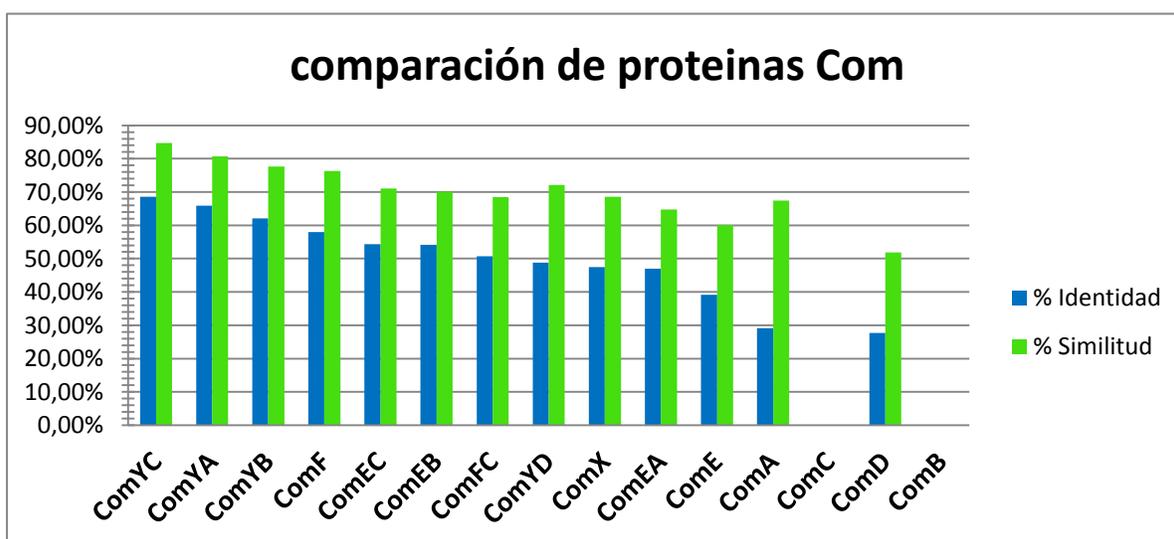
Gen	Locus Génicos	Gen	A <sup>a</sup>		B <sup>b</sup>		C <sup>c</sup>	
			PI	PS	PI	PS	PI	PS
<i>ComX</i>	SPD0014/SSA0016/ SMU1997	<i>ComX</i>	47.44%	68.59%	46.00%	66.00%	49.67%	71.24%
<i>ComC</i>	SPD2065/SSA2394/SMU1915	<i>ComC</i>	0%	0%	44.40%	58.30%	0%	0%
<i>ComD</i>	SPD0469/SSA2379/SMU1916	<i>ComD</i>	27.68%	51.87%	40.80%	60.70%	44.27%	64.80%
<i>ComE</i>	SPD0468/SSA2378/SMU1917	<i>ComE</i>	39.11%	60.08%	54.20%	72.50%	66.40%	86.80%
<i>ComF</i>	SPD2035/SSA1836/SMU0498	<i>ComF</i>	58%	76.33%	59.60%	76.50%	47%	67.12%
<i>CglA</i>	SPD1863/SSA0184/SMU1987	<i>ComYA</i>	65.92%	80.71%	65.90%	80.10%	75.08%	87.22%
<i>CglB</i>	SPD1862/SSA0185/SMU1985	<i>ComYB</i>	62.06%	77.66%	57.30%	75.80%	68.86%	85.47%
<i>CglC</i>	SPD1861/SSA0186/SMU1984	<i>ComYC</i>	68.57%	84.76%	62.70%	76.50%	63.55%	75.70%
<i>CglD</i>	SPD1860/SSA0187/SMU1983	<i>ComYD</i>	48.84%	72.09%	49.20%	71.10%	58.27%	75.59%
	SPD2034/SSA1835/SMU0499	<i>ComFC</i>	50.68%	68.49%	43.90%	58.80%	46.58%	67.12%
<i>Deaminasa</i>	SPD0648/SSA1497/SMU1849	<i>ComEB</i>	54.17%	70.14%	51.90%	71.40%	87.74%	94.84%
<i>CelA</i>	SPD0843/SSA0715/SMU0625	<i>ComEA</i>	46.96%	64.78%	42.20%	62.70%	50.88%	70.35%
<i>CelB</i>	SPD0844/SSA0716/SMU0626	<i>ComEC</i>	54.30%	71.10%	49.70%	69.20%	56.49%	75.37%
<i>ComA</i>	SPD0049/SSA1100/SMU0286	<i>ComA</i>	29.10%	67.40%	64.90%	83.70%	31.50%	54.70%
<i>ComB</i>	SMU0610	<i>ComB</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%

A<sup>a</sup>: Alineamiento de *S. sanguinis* /*S. mutans*

B<sup>b</sup>: Alineamiento de *S. pneumoniae*/*S. mutans*

C<sup>c</sup>: Alineamiento de *S. pneumoniae*/*S. sanguinis*

Alineamiento local realizado en Mather, PI: porcentaje de Identidad ; PS: porcentaje de Similitud.



**Figura 09.** Histograma del análisis comparativo de las secuencias de proteínas Com involucradas en el Sistema de *Quórum sensing* entre *S. sanguinis* y *S. mutans*. BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) mediante Matcher v.6.3.1.

#### 4.3.2. Descripción del modelo del sistema de *Quórum sensing* (QS) en *S. sanguinis* y *S. mutans* en la biopelícula dental.

Realizado el análisis de las posibles proteínas involucradas en la competencia se procedió a describir el sistema de QS (Figura 10), en ambos microorganismos basados en el modelo de la bacteria *S. pneumoniae* de las proteínas validadas experimentalmente en esta especie.

El desarrollo de la competencia genética natural es mediado a través del sistema de *Quórum sensing* (Cvitkovitch *et al.*, 2003). La vía regulatoria se inicia con señales causadas por péptidos estimulantes de la competencia (CSP) en el medio extracelular, este deriva desde un pre-péptido (CSP) codificado por el gen *comC* (SSA2394/SMU1915). Luego es exportado al exterior de la célula a través de un transportador tipo ABC con unión a ATP, codificado por los genes *comA* (SSA1100/SMU0286) y *comB* (SMU0287).

El CSP en el medio extracelular es detectado a través del Sistema regulador de dos componentes (TCS), compuesto por una proteína histidina quinasa que se autofosforila en un residuo de histidina, la cual es codificada por el gen *comD* (SSA2379/SMU1916). La proteína reguladora de respuesta, la cual recibe un grupo fosfato en un residuo de aspartato es codificada por el gen *comE* (SSA2378/SMU1917). La proteína ComE regula la expresión del gen *comX* (SSA0016/SMU1997), cuyo producto es un factor sigma el cual se une a la ARN polimerasa.

La ARN polimerasa junto al factor sigma ComX se adhiere a la caja *com*, este complejo reconoce específicamente la secuencia *TACGAATA*, caja presente en genes tardíos, los cuales son requeridos para sintetizar proteínas de competencia para la internalización del ADN extracelular que se encuentra en el biofilm (biopelícula) dental.

En ambos genomas se encontró el locus Y donde se encuentra la disposición un grupo de genes *comYA* (SSA0184/SMU1987), *comYB* (SSA0185/SMU1985), *comYC* (SSA0186/SMU1984), *comYD* (SSA0187/SMU1983). Estos genes codifican proteínas que presentan regiones con hélices transmembrana posiblemente se ubiquen en la pared y membrana celular. Sus ortólogos a estos genes en *S. pneumoniae* serían *CglABCD*.

Los genes *comEA* (SSA0715/SMU0625) y *comEC* (SSA0716/SMU0626), también codifican proteínas que muestran regiones con hélices transmembranales y estarían ubicadas en la membrana citoplasmática. El gen *comEB* (SSA1497/SMU1849) codifica una posible proteína deaminasa.

Los ortólogos de los genes *comEAC* en *S. pneumoniae* son los genes *CelAB*, *ComF*. Se predice que éstos forman un complejo proteico en forma de un poro o tubo que atraviesa la pared y la membrana celular para la captación e internalización del ADN. En el biofilm se da la competencia entre especies interespecíficas que internalizan el ADN que se encuentran en el medio debido posiblemente a procesos de lisis celular causados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de mutacinas.



#### **4.4 COMPARACIÓN DE PROTEINAS IMPORTANTES EN LA COMPETENCIA Y COEXISTENCIA ENTRE *S. sanguinis* y *S. mutans*.**

##### **4.4.1 Análisis de los complejos enzimáticos ATPasas (tipo F – V) en *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159.**

La fosforilación oxidativa de ambas especies presenta el sistema de ATPasas tipo F, que es común en bacterias. Los operones *unc* y *atp* fueron caracterizados (Tabla 03) mediante MicrobesOnline (<http://microbesonline.org/>) la disposición de los genes en el genoma de *S. sanguinis* y de *S. mutans* y su relación con organismos cercanos filogenéticamente que presentan este sistema de ATPasa-F. Se encontró en *S. sanguinis* que este sistema es codificado por el operón *unc* el cual contiene 8 genes SSA0782 - 0789. En *S. mutans* se presenta el operón *atp* que contiene también 8 genes SMU 1527- 1534. Todos los genes presentan dominios conservados del sistema de ATPasas-F. También se comparó la identidad de los 8 ORFs contenido en los respectivos operones (Tabla 02) y su organización (Figura 11) del contexto genómico relacionados con *E. coli*. *E. coli* presenta 9 genes para codificar el sistema de ATPasas-F entre ellos el gen *atpI*, que no se encontró en el genoma de *S. mutans* ni de *S. sanguinis*.

Además se encontró el operón *ntp*, que presenta 8 genes anotados como *ntpA*, *ntpB*, *ntpC*, *ntpD*, *ntpE*, *ntpG*, *ntpl*, *ntpK* (SSA0085-0093) presentes en el genoma de *S. sanguinis* que podrían codificar posibles proteínas estructurales de la enzima ATPasa vacuolar, sin embargo estos posibles genes están ausentes en *S. mutans* (Tabla 03). Se detallan las características de la enzima ATPasa-V de *S. sanguinis*, con sus códigos EC, números de aminoácidos por proteínas y códigos Pfam encontrados.

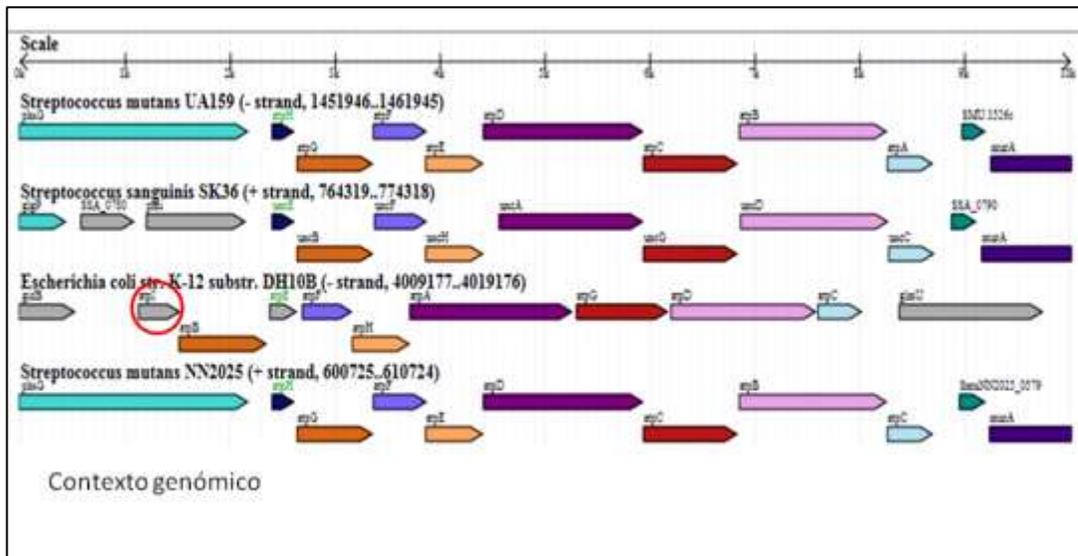
**Tabla 02.** Comparación de la identidad de la enzima ATPasa-F presente en ambas especies expresado en porcentajes de identidad y similitud.

ORFs		Subunidad	<i>atp</i>	<i>unc</i>	% identidad	% similitud
SSA	SMU					
<i>SSA0783</i>	<i>SMU1533</i>	A	G	B	53%	66%
<i>SSA0782</i>	<i>SMU1534</i>	C	H	E	59%	69%
<i>SSA0784</i>	<i>SMU1532</i>	B	F	F	47%	63%
<i>SSA0785</i>	<i>SMU1531</i>	Δ	E	H	35%	48%
<i>SSA0786</i>	<i>SMU1530</i>	A	D	A	85%	90%
<i>SSA0787</i>	<i>SMU1529</i>	Γ	C	G	65%	76%
<i>SSA0788</i>	<i>SMU1528</i>	B	B	D	90%	94%
<i>SSA0789</i>	<i>SMU1527</i>	E	A	C	66%	81%

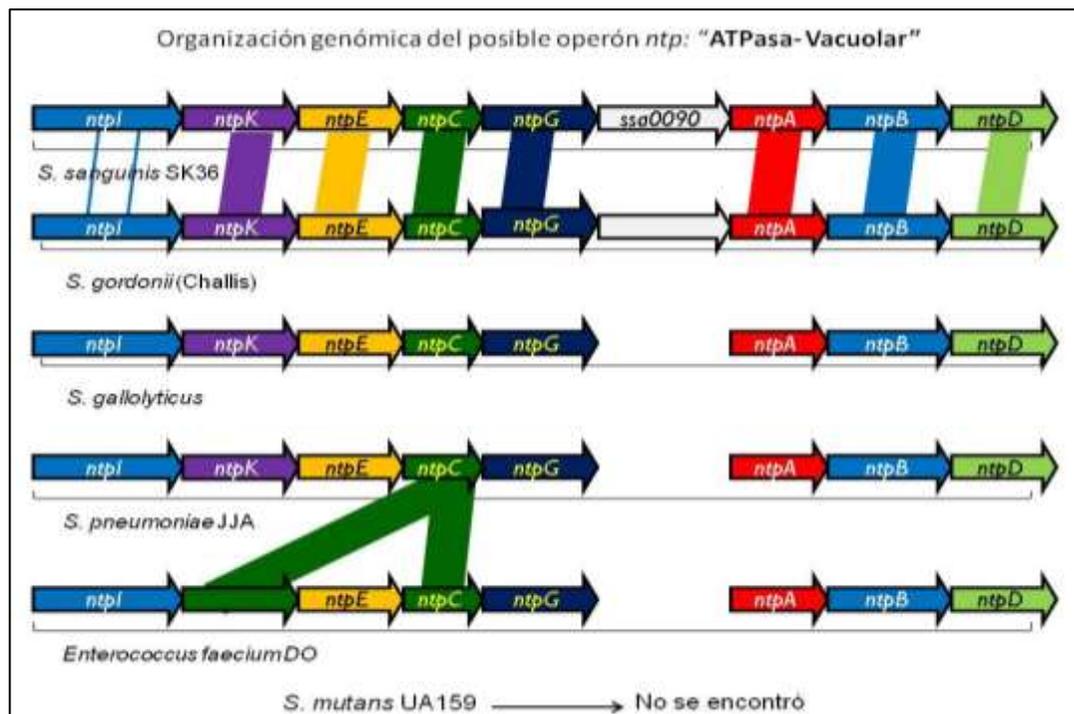
**Tabla 03.** Enzimas ATPasas F presente en ambos genomas. Además *S. sanguinis* presenta posiblemente un grupo de genes alternativo de ATPasa-vacuolares.

ATPasa tipo- V (Procariota)								
Subunidades	I	K	E	C	F	A	B	D
Operón <i>ntp</i>	<i>ntpl</i>	<i>ntpK</i>	<i>ntpE</i>	<i>ntpC</i>	<i>ntpG</i>	<i>ntpA</i>	<i>ntpB</i>	<i>ntpD</i>
<i>S. sanguinis</i>	SSA0085	SSA0086	SSA0087	SSA0088	SSA0089	SSA0091	SSA0092	SSA0093
EC	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14	3.6.3.14
Aminoácidos	651	159	196	207	106	623	464	207
Dominios Pfam	PF01496	PF00137		PF01813	PF01990	PF00006 PF00306 PF02874	PF02874 PF00006 PF00306	PF01813

Se caracterizó el posible operón *ntp* (Figura 12) mediante MicrobesOnline (<http://microbesonline.org/>), la disposición de los genes en el genoma de *S. sanguinis* y su relación con organismos cercanos filogenéticamente que también presentan este enzima ATPasa-V. La disposición y el número de genes para este enzima ATPasa, es similar (ortólogo) a *S. gordonii* (Challis). Es interesante la disposición conservada en ambos genomas del gen *SSA0090*, cuyo producto es una enzima acetiltransferasa, posiblemente con la función de acetilación importante.



**Figura 11. Organización genómica propuesta para los operón *unc* y *atp* de *S. sanguinis* y *S mutans*.** Comparación de la organización de los genes anotados en el genoma de *Streptococcus mutans*, involucrados en la formación de la ATPasa-F respecto a genes ortólogos presentes en otros microorganismos cercanos filogenéticamente. En círculo rojo se indica el gen *atpI* Datos obtenidos con Genome Browser de MicrobesOnline (<http://microbesonline.org/>).



**Figura 12. Organización genómica propuesta para el posible operón *ntp* de *S. sanguinis* SK36.** Comparación de la organización de los genes anotados en el genoma de *S. sanguinis*, involucrados en la formación de la ATPasa Vacuolar (tipo V), respecto a genes ortólogos presentes en otros microorganismos cercanos filogenéticamente. Datos obtenidos con Genome Browser de MicrobesOnline (<http://microbesonline.org/>).

#### 4.4.2 Análisis del regulador transcripcional CcpA entre *S. mutans* y *S. sanguinis*.

La proteína A del control del catabolito, codificada por el gen *ccpA* es un regulador transcripcional esencial en bacterias. Se encontró que el gen está ubicado en el locus SSA1576 de *S. sanguinis* y tiene una longitud de 1005 pares de bases, la proteína funcional contiene 334 aa. Con respecto a *S. mutans*, presenta también el gen *ccpA* ubicado en el locus Smu.1591, tiene una longitud de 1002 pares de bases y codifica una proteína funcional que contiene 333 aa, además ambas especies presentan el dominio PF00356 de la familia *LacI* y presenta el dominio PF00532 de unión al periplasma donde funciona como receptor para quimiotaxis y transporte de algunos azúcares (UNIPROT).

Se realizó un alineamiento local entre las dos secuencias de aminoácidos de *S. sanguinis* y *S. mutans* mediante Matcher arrojando identidad de 78.40% y similitud de 90.40%, con alto score (puntuación), lo cual sugiere que serían homólogos y proceden de un ancestro común cercano.

Además se realizó (Figura 13) un alineamiento múltiple de secuencia (MSA) con las secuencias de aminoácidos de la proteína CcpA de *S. sanguinis*, *S. mutans* y otras especies de estreptococos. Se reconoció el motivo HTH, siendo la región a través de la cual CcpA se une al ADN, confiriéndole su función molecular. Este motivo se encuentra en el extremo N terminal de la proteína, que presenta regiones muy conservadas en los estreptococos analizados.



**Tabla 04.** Número de genes regulados por la proteína CcpA entre *S. sanguinis* y *S. mutans*, según Regprecise.

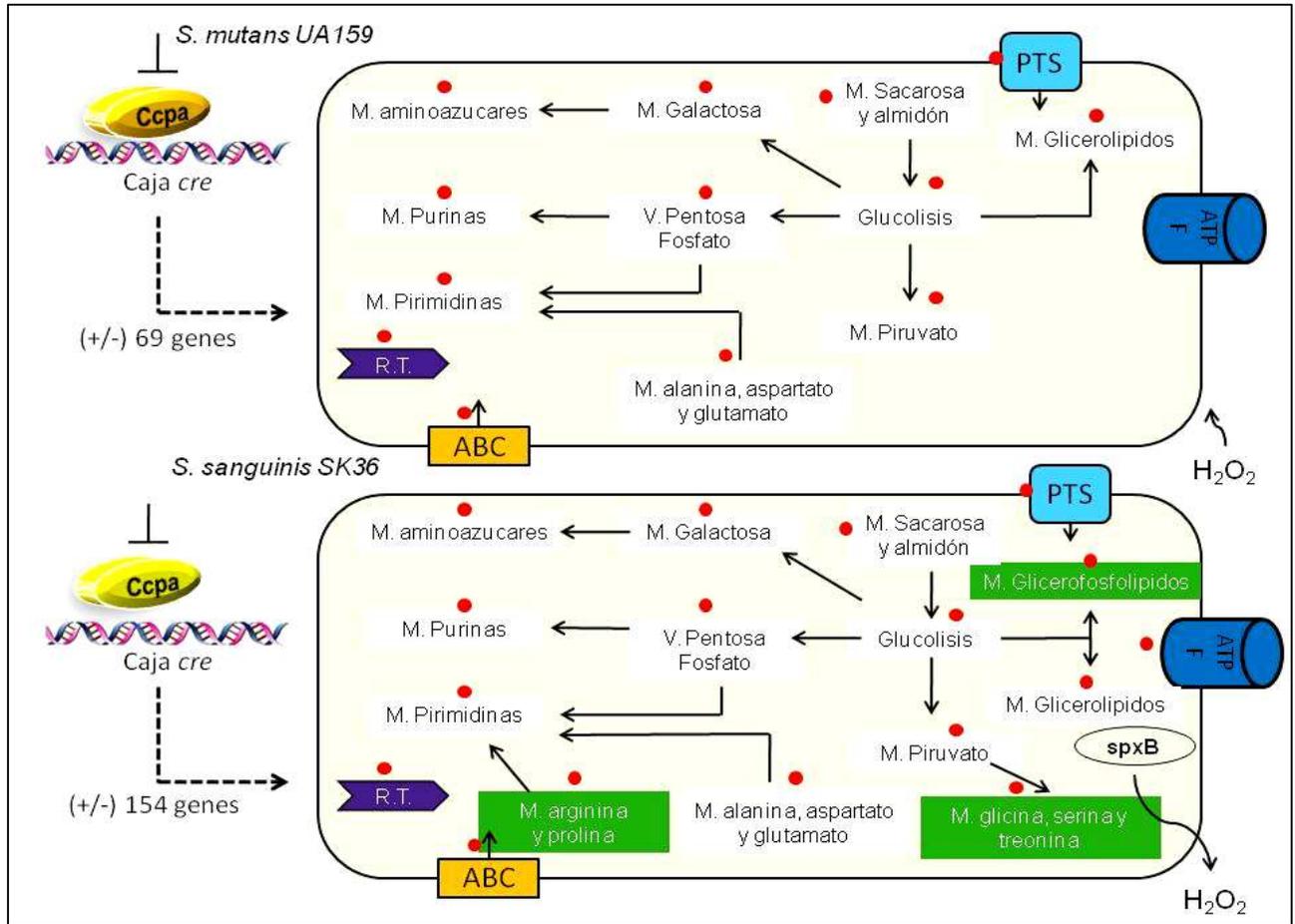
Categorías COGs	SSA y SMU	SSA	SMU
[C] Producción y conversión de energía	5	15	3
[E] Metabolismo y transporte de aminoácidos	1	15	0
[H] Transporte y metabolismos de coenzimas	1	3	2
[J] Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	2	1	1
[K] Transcripción	5	3	2
[G] Metabolismo y transporte de carbohidratos	20	58	8
[F] Metabolismo y transporte de nucleótidos	0	5	1
[M] Biogénesis, envoltura de la membrana y pared celular	0	1	0
[I] Metabolismo y transporte de lípidos	0	1	0
[L] Replicación, recombinación y reparación	0	0	2
[O] Modificación postraduccional y chaperonas	0	0	3
[P] Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	0	0	1
[Q] Biosíntesis de metabolitos secundarios	0	0	1
[R] Predicción de función general única	0	8	5
[S] Función desconocida	0	5	2
[T] Mecanismos de Transducción de señales	0	4	0
Total	34	119	31

Además se encontró (Tabla 04) que *S. sanguinis* y *S. mutans* comparten 20 genes en común para funciones similares relacionados al metabolismo y transporte de carbohidratos [G] estos son regulados por CcpA, en esta categoría también se presentan 58 genes diferentes que son regulados por CcpA en *S. sanguinis* y en *S. mutans* únicamente presenta 8 genes diferentes regulados por CcpA.

La categoría [C] correspondiente a producción y conversión de energía ambos comparten 8 genes en común, además 15 genes diferentes se presentan en *S. sanguinis* y 3 genes con funciones diferentes en *S. mutans*. La categoría [E] metabolismo y transporte de aminoácidos presenta 15 genes regulados por CcpA en *S. sanguinis*, se presentan 1 gen en común en ambas especies y además no se presenta genes únicos regulados en *S. mutans*.

También se analizó cada uno de los genes regulados por CcpA para conocer en cuáles vías metabólicas participan, usando los servidores Regprecise, Microbes Online y KEGG. Se encontró (Figura 14) en *S. mutans*, que CcpA regularía genes que codifican proteínas que participan en vías del metabolismo central y periférico del carbono, metabolismo de pirimidinas y purinas, metabolismo de glicerolípidos y de los aminoácidos alanina, aspartato y glutamato, además CcpA podría regular genes que codifican para el complejo ATPasa tipo  $F_0F_1$ , los sistemas de transporte tipo ABC y sistema de transporte PTS.

En *S. sanguinis*, CcpA regularía genes que participan en vías metabólicas semejantes a las de *S. mutans* UA159, pero además presenta otras rutas adicionales como metabolismo de glicerofosfolípidos y metabolismo de aminoácidos glicina, serina, treonina, arginina y prolina (Figura 14).



**Figura 14. Comparación de las vías metabólicas reguladas por CcpA en *S. mutans* y *S. sanguinis*.** El gráfico es un modelo de las vías que son reguladas mediante unión de CcpA a regiones *cre* de los genes río arriba (elementos de regulación sensibles) Microbesonline (<http://microbesonline.org/>).

#### 4.4.3 Análisis de posibles proteínas con actividad antibacteriana.

##### 4.4.3.1 Búsqueda de proteínas con actividad serina proteasas en *S. sanguinis*.

Se realizó la búsqueda mediante el programa BlastP de un posible ortólogo a la proteína Challisina de *S. gordonii* Challis hallada en Pubmed con actividad proteolítica contra péptidos estimulantes de la competencia (CSP) de *S. mutans*, encontrándose un ortólogo en GenBank (GI: 157151605) la secuencia de la proteína extraída arrojó un ortólogo con significativa puntuación, presentando identidad de 75.40%, dicho gen anotado fue *prtS* ubicado en el locus SSA1882 de *S. sanguinis* SK36 que codifica una posible serin proteasa (subtilisina). Este gen presenta una longitud de 4521 pb con un producto de 1506 aminoácidos.

Se encontró (Tabla 05) que las secuencias de proteínas que se obtuvo a través de la búsqueda en BlastP con significativo score (puntuaciones) en microorganismos del género *Streptococcus* muestran elevado porcentaje de identidad y similitud con la secuencia de *prtS* de *S. sanguinis*. El análisis de las secuencias mostró significativa puntuación entre las proteínas *sgc* (SGO0566) de *S. gordonii* Challis y *prtS* (SSA1882), presentando % de identidad de 75.40 y % de similitud de 85.80 sugiriendo que estas proteínas comparten homología y podrían derivar de un ancestro común, presentando motivos estructurales y funcionales conservados en ambas proteínas. Se buscó mediante la misma estrategia con el servidor BlastP una posible proteína ortóloga a Challisina en *S. mutans*, pero no se encontró. Sin embargo se hallaron bacteriocinas detalladas mas adelante.

**Tabla 05.** Alineamiento de las secuencias de proteínas serin proteasas en el género *Streptococcus* sp. mediante Matcher v.6.3.1.

Especies	Locus génico	Longitud aa	% I.	% S.
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. gordonii</i> Challis	SSA1882 SGO0566	1506	1513	75.40% 85.80%
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. termophilus</i> LMD-9	SSA1882 STER0846	1506	1618	44.50% 60.90%
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. mitis</i> B6	SSA1882 SMI1398	1506	1699	54.70% 71.60%
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. gallolyticus</i> UCN34	SSA1882 GALLO0748	1506	1573	44.70% 62.20%
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. suis</i> P1/7	SSA1882 SSU0757	1506	1585	44.60% 61.30%
<i>S. sanguinis</i> / <i>S. pyogenes</i> M1 GAS	SSA1882 SPy0416	1506	1647	38.40% 55.80%

#### 4.4.3.1.2 Localización celular de la serin proteasa (PrtS).

Se realizó un análisis más exhaustivo de la posible proteasa PrtS, el criterio fue la búsqueda de su localización subcelular y evaluarla con criterios de alta significancia estadística (fidelidad).

En la tabla 06 se muestran datos procedentes del servidor CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), que predice la localización subcelular de proteínas. PrtS (SSA1882) presenta el mayor valor de 3.404 y Sgc (SGO0566) presenta un valor de 2.976, arrojando que estas proteínas están localizadas extracelularmente en *S. sanguinis* y *S. gordonii*. El servidor PSORTb (<http://psort.org/psortb/>) predijo que la proteína PrtS con 96% de confiabilidad y valor de fiabilidad 9.39, se encuentra en la pared celular y similar localización arrojó para la proteína sgc de *S. gordonii*.

Se usó el servidor SignalP 4.0 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), para predecir péptidos señal, (Tabla 06). La proteína PrtS se cliva en las posiciones 33-34 con valor de puntuación 0.804 y en Sgc se cliva en la posición 34-35, presentando valor de puntuación 0.769. De acuerdo a la predicción realizada en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *S. sanguinis* y *S. gordonii*, probablemente atraviesan un proceso de clivaje liberándose el péptido señal, transportándose al espacio extracelular del microorganismo.

**Tabla 06.** Análisis de localización celular de sgc y PrtS mediante CELLO, PSORTb y SignalP.

Localización	CELLO		PSORTb		SignalP	
	PtrS	Sgc	PtrS	Sgc	PtrS	Sgc
		Valor significativa			Péptido señal	
Extracelular	3.404	2.976	0.61	0.61	-	-
Membrana	0.88	0.0	0.0	0.0	-	-
Pared celular	0.522	0.0	9.39	9.40	-	-
Citoplasmática	0.195	0.146	0.0	0.0	-	-
Periplasmática	0.0	0.575	0.0	0.0	-	-
Valor Significante	-	-	-	-	0.804	0.769

#### 4.4.3.2 Analisis de posibles bacteriocinas de *S. mutans* UA159.

Mediante el programa Artemis se buscó posible bacteriocinas (mutacinas) en el genoma de *S. mutans* UA159, la búsqueda consistió en buscar péptido con medidas menores de 100 aa que presenten el motivo -GG- en la secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados, este motivo está presente en pre-péptido comC.

Se encontró (Tabla 07) 14 posibles bacteriocinas candidatas en el genoma de *S. mutans* UA159, se analizó con el programa BlastP, para evaluar la identidad, score y e-value. Los datos arrojan altos hits, significativa identidad por encima del 75% y los e-value también son significantes por encima de  $1e^{-15}$  esto fue un buen criterio para escoger los homólogos de estas proteínas que se encuentran en *Streptococcus* del grupo mutans, se encontró que *S. macacae*, *S. ratti* y otras cepas de *S. mutans* que presentan similares proteínas mutacinas.

**Tabla 07.** Posibles mutacinas con motivo -GG- ubicadas mediante software Artemis en el genoma de *S. mutans* UA159.

Hits/Bacteria	locus	% Identidad	e-value	Score	Aminoácidos	CELLO
<i>S. mutans</i>	smu.150	91%	7 e-36	135	67aa	3.152
<i>S. mutans</i>	smu.151	99%	2 e-42	143	78aa	3.877
<i>S. mutans</i>	smu.283	88%	7 e-37	128	72aa	2.621
<i>S. macacae</i>	smu.299c	79%	1 e-33	120	72aa	4.499
<i>S. mutans N29</i>	smu.423	89%	4 e-38	132	76aa	3.495
<i>S. ratti</i>	smu.1882c	77%	1 e-57	184	117aa	4.202
<i>S. macacae</i>	smu.1889c	85%	7 e-35	124	88aa	3.089
<i>S. mutans</i>	smu.1892c	98%	1e -34	122	61aa	2.994
<i>S. macacae</i>	smu.1895c	96%	1e -28	106	53aa	2.174 *
<i>S. macacae</i>	smu.1902	96%	2e -25	97.4	47aa	2.091*
<i>S. mutans A19</i>	smu.1903	99%	4e -24	94.7	50aa	2.971*
<i>S. mutans NN20</i>	smu.1905	95%	1e -33	119	62aa	3.451
<i>S. mutans</i>	smu.1906	83%	1e -19	84.3	70aa	3.319
<i>S. ratti</i>	smu.1914	86%	6e -32	116	76aa	3.495

(\*) Bacteriocina citoplasmática.

Las posibles bacteriocinas presentan pequeñas secuencias con un promedio de 60 aminoácidos. Además se analizó con el servidor CELLO, arrojando que las proteínas se exportan al exterior de la célula bacteriana, con puntajes por encima del 3.00 indicando que los resultados son significantes, sin embargo en la tabla se muestra el símbolo (\*) indicando que esas proteínas estarían localizadas en el citoplasma. Según el análisis posiblemente serían homólogos a ComC (smu.1895c, smu.1902, smu.1903) presentarían actividad estimulante de la competencia. Estos resultados que arrojó BD CELLO son en base a la composición de los aminoácidos de su secuencia.

Además las secuencias de las posibles bacteriocinas se enviaron al servidor SignalP y arrojó que ninguna bacteriocina es péptido señal. Se analizó las 14 secuencias en la BD MEME v.4.9.0, la BD permite conocer el motivo que se conserva en las secuencias de bacteriocinas y observar el motivo -GG- que se conservan en las secuencias analizadas, este motivo le permitiría ser exportado al exterior por transportadores tipo ABC. Este motivo presenta significancia con *E-value*:  $19 \times 10^{-51}$  presentando aminoácidos con el dominio GG para exportarse y ejercer su probable efecto proteolítico.

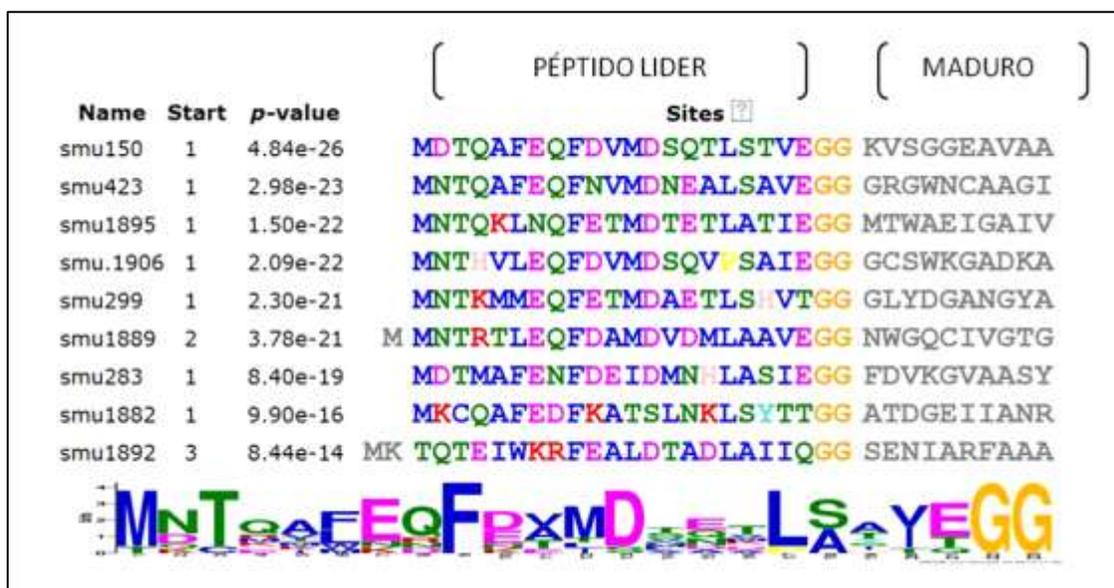
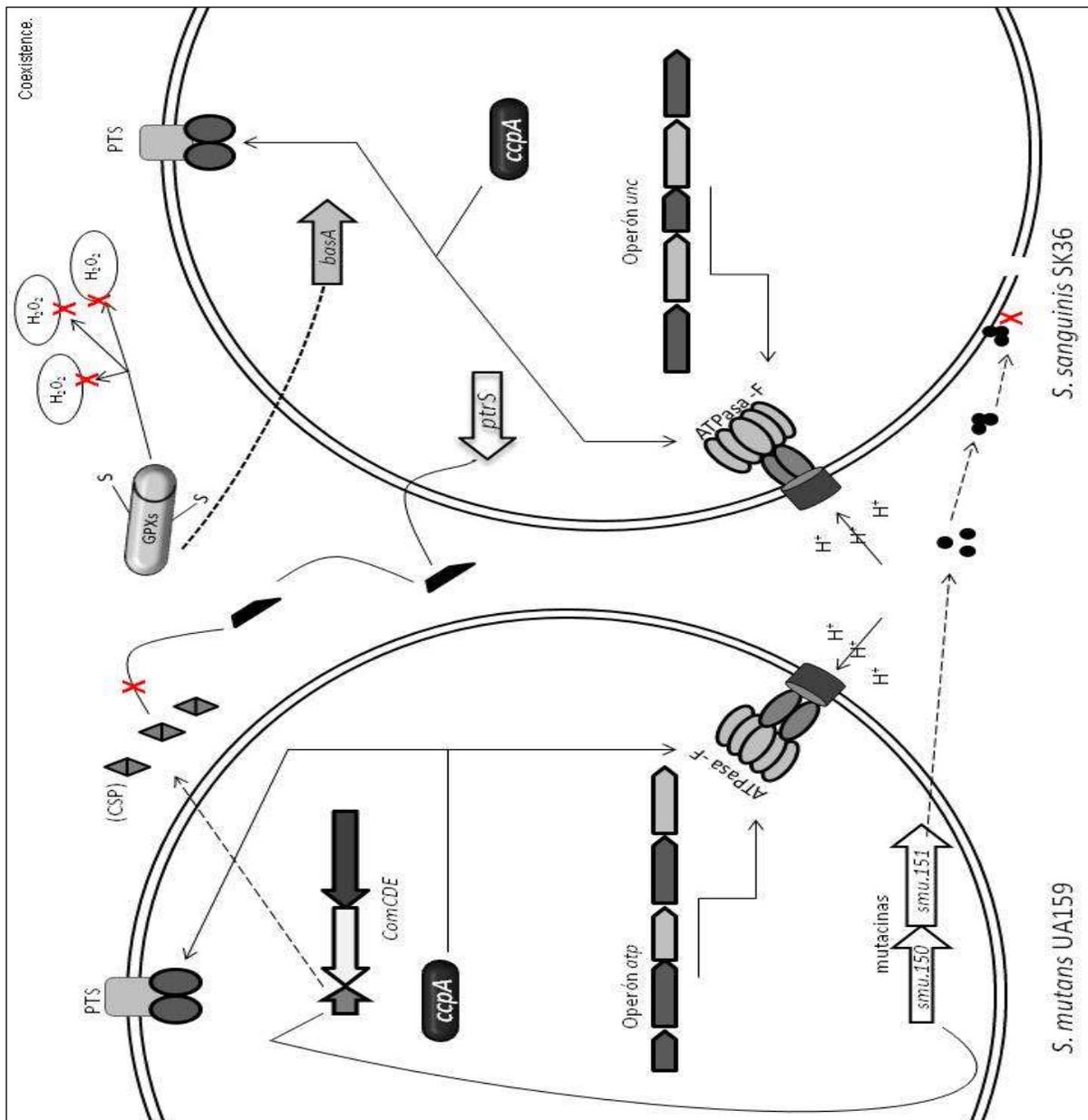


Figura 15. Alineamiento múltiple (MSA) incompleto de posibles bacteriocinas (mutacinas) de *S. mutans* UA159. Motivo -GG- para la exportación al exterior, además la conservación de la zona del pre-péptido y los mayores e-value con significancia. Realizado en MEME.



**Figura 16. Esquema del Modelo predictivo de la coexistencia.** Con respecto a las proteínas analizadas (*in silico*) entre *S. mutans* y *S. sanguinis*. El gráfico indica la coexistencia de *S. mutans* en un mismo tiempo y espacio siendo determinada por péptidos antibacterianos como las mutacinas que se activan por CPS productos del gen *comC*, estos actúan a nivel de membrana de *S. sanguinis*, y como reacción *S. sanguinis* produciría la proteasa *prtS*, que actuaría inactivando los CPS de *S. mutans*, este mecanismo sería usado para poder coexistir ambos microorganismos. El regulador *CcpA* presenta un rol fundamental sin embargo, actúa a nivel de distintas redes reguladoras en ambos microorganismos, regulando el sistema *ATPasa-F* que regula los iones  $H^+$  y los sistemas de transporte (*PTS*) importante en la captación de azúcares en el medio extracelular. El gen *basA* codificaría la enzima glutatión peroxidasa (*GPXs*) protegiendo del  $H_2O_2$  producido por esta misma bacteria (*S. sanguinis*), producto del metabolismo fermentativo.

## V. DISCUSIÓN

La genómica es la rama más reciente de la biología que emplea estrategias basadas en comparación. Los avances tecnológicos en el secuenciamiento del ADN han resultado en la generación de un gran conjunto de datos de información de las secuencias genómicas. Estrategias basadas en genómica comparativa de múltiples cromosomas de especies filogenéticamente distintas, proporcionan huellas acerca de las presiones selectivas que regulan a grupos de genes. La genómica puede ofrecer respuestas sobre los mecanismos de la evolución, variación fenotípica y del material genético externo a través de la transferencia genética horizontal. (Nobrega & Pennacchio, 2003).

En el presente estudio de investigación se analizó dos genomas provenientes de microorganismos de biofilm (biopelícula) dental siendo *Streptococcus sanguinis* SK36 y *Streptococcus mutans* UA159, se planteó un enfoque genómico comparativo a través de herramientas bioinformáticas (*in silico*) para explicar y predecir por qué y cómo se realizaría esta competencia y coexistencia en ambos microorganismos interespecíficos.

La metodología usada por Valdés *et al.*, 2003, fue el modelo de soporte para el presente estudio. Se incluyó el análisis filogenético y la predicción de COGs (*Clusters of Orthologous Groups*), siendo grupos de agrupaciones de ortólogos. Además el análisis de las proteínas de mayor importancia para que se establezcan la competencia y coexistencia de *S. mutans* y *S. sanguinis* se discuten a continuación.

El antagonismo de *S. sanguinis* y *S. mutans* a nivel ecológico ha sido ampliamente documentado (Kreth *et al.*, 2005, 2008). Se desarrollaron varios estudios celulares *in vitro* a través de ensayos microbiológicos, bioquímicos y genéticos para el análisis más definido de la competencia y la convivencia entre ambos microorganismos. (Kuramitsu *et al.*, 2007) A través de estos estudios se concluye que la competencia se establece por presencia de mutacinas de *S. mutans* y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *S. sanguinis*.

En el presente análisis (Figura 02) a través de MAUVE software de genómica se encontró 137 LCBs en diferentes posiciones dentro del genoma, resultados que indican que estos genomas podrían haber presentado eventos de inversión cromosómica, recombinación y eventos de transferencia genética horizontal. Según el análisis se presentan enzimas transposasas, secuencias de inserción (IS), posibles genes de virulencia insertados y grupos de genes hipotéticos. Todos los elementos del genoma, podrían provenir posiblemente de eventos de transformación genética ubicados dentro de las secuencias cromosómicas, que podrían equipar a estos microorganismos para mantener su nicho ecológico en la placa dental frente a sus competidores y además escapar de la defensa del huésped. Este dato se relaciona con el estudio de Maruyama *et al.*, (2009) quienes indican que en un análisis de genómica comparativa en dos cepas de *S. mutans* se encontró que la diversidad genómica presentaba elementos transponibles, como secuencias de inserción (IS). Además en zonas específicas de la cepa se encontró sistemas de restricción/modificación y sistemas para el transporte y síntesis de péptidos antimicrobianos. Maruyama *et al.*, (2009) concluyen que la infección por fagos no es necesario para la adquisición de nuevos genes.

De acuerdo con el análisis (Figura 03) realizado de las categorías COGs (*Clusters of Orthologous Groups*). *S. sanguinis* y *S. mutans* presentan proteínas en común con respecto a la categoría [C], de producción y conversión de energía, por encima del 3.00% de sus ORFs. Con respecto a la categoría [G] Metabolismo y transporte de carbohidratos, presentan un porcentaje similar cercano al 9.00% de sus ORFs. Estos datos son consistentes con el estudio realizado por Xu *et al.*, (2007) donde indican que *S. sanguinis* aparentemente podría utilizar una amplia gama de carbohidratos para su supervivencia. Identificándose más de 50 posibles transportadores de carbohidratos, incluyendo enzimas del sistema fosfotransferasa específicas para el transporte de la glucosa, fructosa, manosa, celobiosa, glucósidos, , lactosa, trehalosa, galactitol y maltosa. Por lo tanto, esta bacteria posiblemente posee un robusto sistema para la generación de energía por fermentación de azúcares y otros carbohidratos siendo similar a *S. mutans*.

Este resultado de las categorías COG [C] y [G] son consistente debido a que *S. sanguinis* y *S. mutans* presentan juegos de genes homólogos similares reflejando que ambas especies comparten un mismo nicho oral siendo este un ambiente rico en azúcares (Ajdic *et al.*, 2002).

Con respecto a la categoría [E] metabolismo y transporte de aminoácidos ambas especies presentan proteínas por encima del 14.30% de sus ORFs totales, indicando que ambos presentan la capacidad de utilizar aminoácidos en su nutrición. Según indican Xu *et al.*, (2007), *S. sanguinis* podría poseer la capacidad de sintetizar de *novo* todos los aminoácidos esenciales excepto los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), lisina y triptófano. Respecto a *S. mutans* Ajdic *et al.*, (2002) da a conocer que todo el repertorio de genes para la biosíntesis de aminoácidos se encuentran presentes en su genoma.

En las categorías [J]traducción, biogénesis y estructura ribosomal, [K] Transcripción y [L] replicación, recombinación y reparación la especie *S. mutans* UA159 presentan una mayor cantidad de proteínas candidatas con respecto a *S. sanguinis* SK36. Estas categorías J, K y L vitales para procesos bioquímicos, genéticos y moleculares dentro de la célula; lo que sugiere que *S. mutans* podría tener ventaja con respecto a su competidor *S. sanguinis* dentro del *biofilm* dental.

En las categorías [N] motilidad celular, [U] tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular y [H] metabolismo y transporte de coenzimas *S. sanguinis* SK36 presenta una mayor cantidad de proteínas candidatas con respecto a *S. mutans*. Las proteínas de estas categorías COGs le podrían otorgar cierta ventaja en la cavidad oral. Por ejemplo *S. sanguinis* posee fibrillas cortas y largas implicada en la adhesión estreptocócica y la virulencia según Xu *et al.*, (2007).

En la categoría [H] de los cofactores *S. sanguinis* presenta los genes codificantes necesarios para biosíntesis anaeróbica de cobalamina. La ruta biosintética completa de la vitamina B<sub>12</sub> se encuentra disponible en su genoma. Según Chen *et al.*,(2003) en Xu *et al.*, (2007), sería la primera vez que se identifica la vía completa en estreptococos, aunque se han encontrado en *Streptococcus salivarius* y *S. thermophilus* tres proteínas implicadas en el transporte y biosíntesis de cobalamina y el cobalto (cbiMQO). Estos datos contrastan con nuestro resultado del anterior análisis del genoma (Figura 02) donde se encontró un posible grupo de genes que codifica para proteínas involucradas en la biosíntesis de vitamina B<sub>12</sub> en *S. sanguinis*.

Las categorías [W] de estructuras extracelulares y [B] estructura dinámica de la cromatina presentan una proteína ortóloga candidata en el genoma de ambas especies, lo que sugiere que estas categorías funcionales no se requieren para su supervivencia dentro de la biopelícula oral. La categoría [R] Predicción solo de función general, encontró proteínas pobremente caracterizadas ubicándose proteínas de transporte, proteínas integrales de la pared celular, proteínas citoplasmáticas pero que presentan posible función y algunas sin función, presentando algunos motivos caracterizados. Datos que coinciden con los reportados por Ajdic *et al.*, (2002) quienes indican que el análisis de la secuencia del genoma de *S. mutans* reveló que alrededor del 16% de las proteínas predichas son proteínas únicas. Además Ajdic *et al.*, (2002) habla de la presencia de un amplio grupo de proteínas que no están caracterizadas pero que podrían estar implicadas en la virulencia, el transporte y la regulación transcripcional. Las 11 categorías funcionales COGs restantes manifiestan ciertas diferencias con respecto al porcentaje de ORFs lo cual podría otorgar ciertas ventajas por algunas proteínas o un grupo de proteínas en uno u otro microorganismo.

Además Xie *et al.*, (2010) realizaron un estudio de metagenómica en base al ARNr 16S purificado de la placa oral humana en estado saludable , encontrándose en el análisis que un amplio grupo de bacterias orales de distintas especies y ubicaciones dentro de la cavidad oral comparten categorías funcionales COGs que podría denominarse “estándar” siendo las categorías predominantes el metabolismo de carbohidratos (11.88%), derivados de ácidos y aminoácidos (7.89%), metabolismo de proteínas (9.34%), metabolismo de vitaminas, cofactores, grupos prostéticos y pigmentos (6.26%), biogénesis de la pared celular y cápsula (5.24%), metabolismo del ARN (4.53%), metabolismo del ADN (6.07%), metabolismo de nucleótidos y nucleósidos (3.55%), transporte de membrana (3.16%), división celular (2.1%), respiración y energía (3.53%), regulación y la señalización celular (1.31%), metabolismo lípidos y ácidos grasos (1.27%), motilidad celular y quimiotaxis (1.11%), metabolismo del fosforo y azufre (1-1.07%).

Estos datos se asemejan en cuatro categorías funcionales realizadas en este estudio como el metabolismo de aminoácidos, de nucleótidos, de lípidos y ácidos grasos, biogénesis de la pared celular y la cápsula, las otras categorías son medianamente cercanas a nuestros datos, esto fortalece el análisis de las categorías COGs en *S. sanguinis* siendo un colonizador primario y principal de la placa dental en condiciones de salubridad. Sin embargo el análisis de Xie *et al.*, fue sobre un COGs global de miles de especies bacterianas caracterizadas molecularmente, pero estos datos indican el posible comportamiento de las bacterias dentro un nicho ecológico tan peculiar como el biofilm dental.

Con respecto al mapa de la vía del metabolismo del piruvato. Los resultados (Figura 05) realizados a través de KEGG y MetaCyc sobre el análisis de la vía metabólica del piruvato entre *S. sanguinis* y *S. mutans* indican que ambos microorganismos presentan similar juego de proteínas ortólogas para metabolizar el piruvato y estas comparten un promedio de identidad del 56.03 % entre el conjunto de proteínas analizados en Matcher 6.6.0 (Dato no mostrado).

El modelo de reconstrucción metabólica propuesto para el metabolismo del piruvato comparado entre *S. sanguinis* y *S. mutans* revela similitud (ortólogos) y es consistente con el modelo propuesto por Carvalho *et al.*, (2013) en *S. pneumoniae* donde indican que la glucosa se oxida a piruvato a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis). El piruvato es el sustrato de tres enzimas que compiten, lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato formiato-liasa (PFL) y piruvato oxidasa (SpxB). En *S. sanguinis* y en *S. mutans* se presenta la fermentación homoláctica reduciendo el piruvato en lactato, a través de la lactato deshidrogenasa (LDH), mientras que la fermentación ácido mixta conduce a formiato, acetato y etanol.

Ajdic *et al.*, (2002) manifiesta que la fermentación de carbohidratos por *S. mutans* es la principal fuente de producción de energía para el microorganismo y confirma que posee una completa vía glucolítica que conduce a la producción de piruvato que se reduce a diversos productos de la fermentación (ácido láctico, formiato, etanol, y acetato). Estos procesos metabólicos son importantes para la oxidación de NADH, así como la síntesis de un ATP adicional debido a la conversión de piruvato a acetato. Por lo tanto estos estudios avalan nuestro análisis de reconstrucción del metabolismo del piruvato tanto en *S. sanguinis* como en *S. mutans* que utilizan la glucosa para obtener piruvato y luego obtener distintos productos durante el flujo energético. Además el análisis (Figura 05) arrojó que *S. sanguinis* presenta 3 enzimas las cuales podrían darle ventaja a nivel de flujo energético. Según Xu *et al.*, (2007) en un estudio del patrón filético sugirieron que los genes que codifican para estas enzimas fueron adquiridos por transferencia genética horizontal (HGT).

Respecto a la enzima piruvato fosfato diquinasa (PPDK) EC 2.7.9.1 (ssa1053) Saavedra *et al.*, (2005) describe que en *E. histolytica*, ha sido propuesta como objetivo terapéutico adecuados para drogas, debido a su ausencia en las células humanas. La PPDK de *S. sanguinis* podría ser usada como posible blanco terapéutico.

Piruvato oxidasa EC 1.2.3.3 (SSA0391) presenta estudios de caracterización molecular y se ha analizado a su gen *spxB* involucrado en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SpxB es una descarboxilasa que cataliza la conversión de piruvato, fosfato inorgánico (Pi) y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y acetil fosfato, que actúa como un dador de grupos fosforilo de alta energía (Ramos-Montañez *et al.*, 2008). En un reciente estudio realizado por Geng *et al.*, (2012) de genómica y transcriptómica en *S. parasanguinis* informan la presencia de un locus *Spaf\_1788* y que la expresión de este codifica una piruvato oxidasa la cual produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el crecimiento anaeróbico.

Kreth *et al.*, 2008 concluyen en un estudio que *S. sanguinis* produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es antagónico contra el cariogénico *S. mutans*, pero es resistente a su propio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además indican que la expresión y producción de SpxB es dependiente de la disponibilidad de oxígeno y disminuye durante el crecimiento anaeróbico. Sin embargo la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas podría ser suficiente para funcionar en la competencia entre especies. La ventaja de *S. mutans*, radica en que produce mutacinas inhibitoras del crecimiento, independientemente de la disponibilidad de oxígeno.

La fosfoenolpiruvato sintasa EC 2.7.9.2 (SSA1012), de *Escherichia coli*, cataliza la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP). Ecuación: Piruvato + ATP → AMP + PEP + Pi. Esta enzima es esencial para el crecimiento de *E. coli* en tres fuentes diferentes de carbono como piruvato, lactato y alanina. Los mutantes que carecen de fosfoenolpiruvato sintasa no pueden crecer en esas tres fuentes de carbono, ni formar glucógeno a partir del piruvato. Esta enzima fosfoenolpiruvato sintasa le podría dar una ventaja a *S. sanguinis* frente a su competidor *S. mutans*, sin embargo no hay estudios a profundidad.

En *S. sanguinis* y *S. mutans* se encontró proteínas para el ciclo de Krebs incompleto que sólo contiene las enzimas para convertir el oxaloacetato en 2-oxoglutarato. Aunque es evidente que es incapaz de producir ATP en forma directa, este fragmento de la vía probablemente generaría productos intermedios en la síntesis de aspartato y glutamato.

Ajdic *et al.*, (2002) sostienen que los estreptococos son incapaces del metabolismo respiratorio aerobio y no presentan los genes requeridos para la cadena de transporte de electrones.

Las reacciones aeróbicas conducen a la acumulación de especies reactivas de O<sub>2</sub>, siendo tóxicos para las células. El estrés biótico y abiótico puede desencadenar aumento en la generación de especies reactivas de O<sub>2</sub> (ROS), tales como radicales superóxido, radicales hidroxilo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio intracelular. En este contexto aeróbico los organismos han desarrollado varios sistemas enzimáticos y no enzimáticos para neutralizar estos compuestos. Los sistemas enzimáticos contra el estrés son codificados por productos génicos tales como superóxido dismutasa, catalasas, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa (Fink & Scandalios, 2002).

La enzima glutatión peroxidasa (GPXs), cataliza la descomposición de hidroperóxidos orgánicos (lípidos - ROOH) y peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a través de la siguiente reacción: **ROOH + 2GSH → ROH + GSSG + H<sub>2</sub>O**. GSH y GSSG muestran la GPX reducida y oxidada respectivamente.

Los resultados (Figura 06) realizados en KEEG y MetaCyc, se encontraron genes codificantes para la vía de utilización del glutatión. Se hizo la comparación de esta vía entre *S. mutans* y *S. sanguinis* y ambos presentan un gen que codifica el enzima anotada como glutatión reductasa (EC 1.8.1.7). Además se observó que ambos microorganismos biosintetizan glutatión, posiblemente proveniente del metabolismo de glutamato y cisteína. Existen referencias acerca de la utilización de glutatión en *S. mutans*, según estudio realizado por Sherrill & Fahey, 1998 donde se concluyó que *S. mutans* metaboliza y asimila rápidamente el glutatión dentro de la célula, indicando que podría servir como fuente de nutriente. Sin embargo, en condiciones normales de crecimiento en medios que tienen moderado contenido de glutatión *S. mutans* acumula significativos niveles de GSH celular. Esto podría protegerlo contra el daño oxidativo como sucede en otros organismos que sintetizan glutatión. Por ejemplo, en *Escherichia coli* donde GSH se cree que desempeña un papel protector contra las toxinas reactivas de tiol, cuando *S. mutans* en

fase de crecimiento fue enfrentado con agentes oxidantes de tiol, esa condición condujo a la acumulación de GSH lo que ofreció protección contra la inhibición del crecimiento. Entonces se podría extrapolar que la acumulación de GSH en *S. mutans* puede contribuir a su capacidad para soportar el desafío oxidativo.

En el análisis del genoma de *S. sanguinis* también se encontró (Figura 06) una proteína llamada basa. Una posible enzima glutatión peroxidasa EC (1.11.1.9; 1.11.1.12), codificada por el gen *basA* (SSA1523). Esta enzima es un punto para investigar a fondo, *basA* podría degradar  $H_2O_2$  y convertirlo en  $H_2O$ , además degradar los hidroperoxi-lípidos y eliminar  $H_2O$ , esta proteína fue investigada por Brenot *et al.*, 2004 quienes indican que glutatión peroxidasa EC (1.11.1.9) es el nombre general para una familia de múltiples isoenzimas que catalizan la reducción de  $H_2O_2$  o hidroperóxidos orgánicos a agua o correspondientes alcoholes.

Sin embargo, el conocimiento es mínimo acerca de la glutatión peroxidasa en procariontes. Las excepciones son *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pyogenes*, donde se ha demostrado que las GPXs están involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo. La enzima *basA* comparte identidad del 41%, (Figura 07) con respecto a su ortólogo en *E. coli* (*btuE*). Ambas presentan cisteínas y glicinas conservadas en el sitio activo de la enzima. Tal análisis sugiere que se debe validar experimentalmente, debido a que podría presentar actividad antioxidante contra el  $H_2O_2$ , que produce esta bacteria o incluso otras especies dentro del biofilm. Esta hipótesis que se fundamenta con estudios de Arenas *et al.*, 2010 quienes indican que *BluE* protege a *E. coli* contra los efectos perjudiciales del estrés oxidativo. Esta enzima preferentemente degrada lípidos peróxidos en condiciones aeróbicas. Gibson *et al.*, 2000 indican que el  $H_2O_2$  es un subproducto del metabolismo fermentativo de *S. pyogenes*. Esta bacteria puede sobrevivir a las concentraciones mM de peróxido que produce endógenamente, debido a presencia de la enzima glutatión codificada por el gen *gopA* que es homólogo a *BasA* de *S. sanguinis*.

Geng *et al.*, 2012 mediante estudios genómico y transcriptómico indican que *S. parasanguinis* para llegar a la válvula de corazón con éxito y establecer la infección, presenta un repertorio de genes codificados en su genoma para evadir las defensas innatas del huésped. Las enzimas que exhibe *S. parasanguinis* para tal propósito son la superóxido dismutasa (*Spaf0708*), tiorredoxina (*Spaf0302*, *Spaf0423*, *Spaf1008* y *Spaf1295*), tiorredoxina reductasa (*Spaf0208* y *Spaf0772*), y glutatión peroxidasa (*Spaf1379*).

BasA en *S. sanguinis* SK36 incluso podría ser preponderante y participar en procesos de patogénesis como lo indica Brenot *et al.*, 2004 en sus resultados donde presenta la primera evidencia directa donde glutatión peroxidasa contribuye a la patogénesis bacteriana. Glutatión peroxidasa (gen *GpoA*) de *S. pyogenes* es importante en la infección y es requerida para interactuar con la célula huésped en el proceso de inflamación. Se concluye, que la enzima basA presente en *S. sanguinis* podría conferirle ventaja ecológica con respecto a *S. mutans*, al adaptarse mejor a las condiciones del medio en condiciones de estrés oxidativo dentro del biofilm oral al degradar ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que son perjudiciales.

En el resultado obtenido del análisis filogenético (Figura 08) con respecto al enzima glutatión peroxidasa (GPx) de *S. sanguinis*, se encontró que la enzima presenta alta identidad con glutatión peroxidasa de *S. gordonii* Challis, posiblemente divergieron a través de un proceso evolutivo cercano de un ancestro común. Se muestra la raíz donde están formado un linaje los estreptococos del grupo mitis con *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. pneumoniae* y *S. mitis*, estos resultados contrastan positivamente con los encontrados por Kawamura *et al.*, 1995 donde realizó un árbol filogenético para obtener datos acerca de las relaciones evolutivas de los estreptococos en base a su secuencias ARN 16S encontrando al grupo mitis, *S. oralis*, *S. mitis*, y *S. pneumoniae* exhibiendo más de 99% de identidad en la secuencia.

Las enzimas glutatión peroxidasas de *S. gordonii* y *S. sanguis* mostraron un alto nivel de similitud exhibiendo 97,01% de identidad en la secuencia. *S. gordonii* fue descrito por Kilian *et al.* 1989 en Kawamura *et al.*, 1995 como una nueva especie que era distinta de *S. sanguis* (actualmente *S. sanguinis*). Este estudio fortalece el resultado del análisis filogenético de glutatión. Por otra parte el modelo matrix JTT utilizado en este análisis que mide distancia evolutiva es adecuado.

Con respecto a GPx de *E. coli* están alejadas evolutivamente sin embargo en el análisis realizado de alineamiento múltiple esta enzima comparte sitios catalíticos conservados con respecto a la posición de las glicinas y las cisteínas, además su identidad es de 41%. Con respecto al grupo externo, el eucariota *S. cerevisae* fue consistente encontrarlo compartiendo una rama alejada evolutivamente con las demás bacterias, sin embargo en *Shewanella oneidensis* la enzima glutatión es anterior evolutivamente con respecto a *S. cerevisae*, la posible respuesta podría ser que la enzima glutatión de ambos organismos presenta tasas de mutación diferentes. Lin *et al.*, 2011 analizan la relación filogenética de dos cepas de *S. gallolyticus* en base a ARNr 16s, encontrándose en el árbol a *S. sanguinis* emparentado con *S. gordonii* en una rama y *S. mitis* con *S. pneumoniae* en otra rama pero ambas provenientes de la raíz de un ancestro común, además *B. subtilis* se encontraba compartiendo un ancestro con la rama total del linaje de estreptococos, *B. subtilis* fue usado como grupo externo en el análisis. Datos que contrastan y además garantizan el análisis del árbol realizado en este estudio.

La comunicación entre célula-célula, es una actividad fundamental realizado por muchos tipos de células. En bacterias grampositivas, el Sistema de *Quórum sensing* (QS) consiste en tres componentes, un péptido señal (CSP) y un Sistema regulador de dos componentes (TCS), el cual presenta un sensor histidina quinasa anclado a la membrana y una proteína reguladora de respuesta (Kleerebezem *et al.*, 1997). El QS regula la virulencia en muchos patógenos en humanos (Bassler, 1999). El sistema de QS en bacterias grampositivas posibilitan la formación de biofilms (Li *et al.*, 2002a), desarrollo de la competencia genética (Havarstein *et al.*, 1995), la respuesta de la tolerancia a ambientes ácidos y la producción de péptidos antimicrobianos (Kleerebezem y Quadri., 2001).

Los resultados encontrados (Tabla 01 y Figura 09) muestran altos valores de identidad en la mayoría de las proteínas ortólogas de la competencia (Com) comunes en ambos microorganismos, sin embargo la proteína comC presente en *S. sanguinis* es de copia única y no presenta de motivo -GG- para ser exportado al exterior por los transportadores ABC. En *S. mutans*, ComC presente el motivo -GG- que es reconocido por los transportadores ComAB, para el procesamiento y la exportación.

Además no se encontraron proteínas de transporte ComAB en *S. sanguinis*, solamente se encontró a un transportador que podría cumplir función de ComA. Esta proteína presenta alta divergencia con identidad de 29.10%, respecto a la proteína ComA de *S. mutans*. No se encontraron ortólogos de ComB en el genoma de *S. sanguinis*, posiblemente esa función es reemplazada por transportadores del tipo ABC. Un transportador candidato comA es el gen presente es el locus ssa1100 que funciona como transportador tipo ABC dependiente de ATP exportador de hemolisina, este comparte identidad de 29.8% con respecto a la proteína transportadora ComA de *S. mutans* UA159.

Las proteínas tardías ComYC, ComYA y ComYB, muestran altos porcentajes de identidad por encima del 60% lo que sugiere que estas proteínas en el género *Streptococcus* presentan baja divergencia. Con respecto a proteínas anotadas como ComF, ComEC, ComEB, ComFC, muestran también porcentajes por encima de 50% de identidad. Posiblemente estas proteínas presenten dominios transmembrana relacionados al andamiaje específico en la membrana de estas especies. Asimismo los ortólogos en *S. pneumoniae* (Tabla 01) son los genes *CelAB*, *CglABCD*, *ComF*. Los resultados del análisis se asemejan con los encontrados por Lunsford *et al.*, (1997) quienes encontraron en *S. pneumoniae*, pequeñas proteínas que se combinaban prediciendo que podrían formar un poro, el cual abarca la pared y la membrana celular funcionando como una ruta directa para la captación e internalización del ADN extracelular.

Rodríguez *et al.*, (2011) en un estudio de microarreglos en  $\Delta comC$  de *S. sanguinis* indican que en el estado donde se activan los genes tardíos *comC* reguló 17 genes que pertenecen a la categoría [L] Replicación, recombinación y reparación. Estos datos sugieren que *comC* activa genes involucrados en la transferencia genética, después de

captar ADN extracelular del biofilm y el microorganismo activaría enzimas responsables de insertar el material genético dentro de la secuencia cromosómica.

Se describió y reconstruyó (Figura 10) el sistema de QS en ambos microorganismos con respecto a los parámetros % de identidad y e-value con el programa BlastP, indicando que las proteínas de la competencia Com en general muestran conservación. Siendo las excepciones comC que es único en *S. sanguinis*. Además *S. sanguinis* no presenta los genes *comAB* para la exportación de CSP proveniente de la maduración del comC. El operón *comDE* es bastante conservado en ambas especies, el operón *comYABCD* presenta significativa conservación entre ambas especies y con respecto a *S. pneumoniae*, estos genes codifican proteínas importantes en la transformación genética para captación de ADN extracelular.

Perry *et al.*, (2009) realizaron un análisis con microarreglos en *S. mutans* para evaluar la expresión genética dependiente de CSP. La competencia genética en esta especie se ha demostrado que difiere con respecto a *S. pneumoniae* y *S. gordonii* en varios aspectos como retraso en la inducción de la expresión genética de la competencia, transformación en respuesta a CSP y además se han identificado un gran número de genes que codifican para bacteriocinas regulados corriente arriba. Los genes *comC* y *comDE* de *S. mutans* funcionan principalmente en la inducción de producción de bacteriocinas y la competencia genética presentaría un papel secundario.

Según la reconstrucción realizada en este estudio (Figura 10) indica que el sistema de QS en *S. sanguinis* y *S. mutans* presenta 13 proteínas ortólogas de la competencia (Com) con significativa conservación, sin embargo ambos sistemas de QS podrían cumplir funciones diferentes dependiendo del momento en que requieren ser activados. Por lo tanto *S. sanguinis* posiblemente podría presentar mayor competencia para la transferencia genética horizontal con respecto a *S. mutans*, esta característica podría ser relevante frente a su competidor dentro del biofilm dental.

Por otro lado Merritt *et al.*, (2007), indican en un estudio en *S. mutans* UA159, que encontraron el operón *hdrRM*, siendo *hdrR* (regulador de respuesta) y *hdrM* (proteína de membrana). Este operón regula la competencia genética y además activa la transcripción de genes productores de mutacinas. El operón podría establecer un nuevo sistema de regulación responsable de mediar respuesta celular frente al ambiente de alta densidad celular. Por lo tanto se sugiere que *S. mutans* usaría un sistema de competencia diferente a *comCDE*, siendo el operón *hdrRM* u otro para responder a ambientes de alta densidad celular.

Las ATPasas reversibles tipo F y V son máquinas moleculares asociadas a la membrana celular que acoplan la transferencia de protones o cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) a través de la membrana con hidrólisis o síntesis de ATP. Las ATPasas tipo-V son relacionadas a las ATPasas tipo-F, formadas por subunidades embebidas en la membrana. El complejo  $V_0$  es equivalente a  $F_0$ , siendo una subunidad periférica y  $V_1$  es equivalente a  $F_1$  (Nishi & Forgac, 2002).

El dominio citoplásmico ( $F_1$ ) esta formado de tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  en una estequiometria de 3:3:1. La función del dominio citoplásmico es catalizar la síntesis de ATP cuando los protones se mueven desde el exterior de la célula hacia el interior del citoplasma, a través del dominio unido a la membrana, o para escindir el ATP cuando los protones son bombeados al exterior de la célula, como en el caso de los estreptococos orales. El dominio de membrana ( $F_0$ ) consta de cinco subunidades,  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  con estequiometria (1:2:9 o 10:1:1), funcionando como un canal específico de protones unido a la membrana. (Kuhnert & Quivey, 2003).

Los resultados (Figura 11) indican que el contexto genómico de *S. sanguinis* como de *S. mutans* ambos presentan una organización genética similar a la observada en *E. coli* donde el operón *atp* guarda similitud con el grupo de genes que codifican para el enzima ATPasa-F. En la mayoría de estreptococos orales se ha mantenido similar el contexto genómico de genes codificantes para ATPasa-F.

Estos resultados guardan relación con el estudio realizado por Smith *et al.*, 1996, quienes encontraron que la organización genética del operón bacteriano del ATPasa-F de *S. mutans* es similar a la de *E. coli*, donde los genes de las subunidades ancladas a la membrana aparecen primero, seguidos por los genes que codifican las subunidades catalíticas.

Según los datos mostrados en la Tabla 02, *S. sanguinis* presenta un grupo de 8 proteínas que componen el complejo ATPasa-F. Estas fueron comparadas con sus ortólogos de *S. mutans*, y muestran un promedio de identidad de 62.5%, siendo las subunidades del dominio F<sub>1</sub> (citoplasmática) las que mostraron un nivel más alto de identidad que proteínas del dominio F<sub>0</sub> (membrana), sugiriendo que el complejo F<sub>1</sub> posiblemente presenta motivos funcionales y estructurales conservados para la función catalítica.

Por consiguiente las proteínas de la enzima ATPasa-F encontradas en el análisis presentan soporte experimental en el trabajo de Smith *et al.*, (1996) quienes con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares por los que *S. mutans* regula la enzima ATPasa, llevaron a cabo la caracterización del operón ATPasa-F de *S. mutans*, incluyendo su clonación y determinación de la secuencia de nucleótidos. Además las secuencias de aminoácidos deducidas para los ocho proteínas estructurales del operón ATPasa-F en *S. mutans* mostraron que este grupo de proteínas son homólogas a las subunidades del ATPasa de *E. coli*.

Con respecto a la función de la ATPasa-F existe estudios previos de Kuhnert & Quivey, (2003) quienes evaluaron la competencia de *S. mutans* frente a *S. sanguis* con respecto a la habilidad de aciduricidad, donde en ambos microorganismos se indujo la actividad ATPasa. *S. sanguis* se cultivó en un quimiostato en estado de equilibrio y se redujo el pH gradualmente a 5.9 por debajo de este nivel, el organismo fue incapaz de sobrevivir. Sin embargo en *S. mutans* alcanzo niveles absolutos de 7.0 a 5.0. Por lo tanto, se considera que ambos microorganismos poseen enzimas inducibles por ácido, en *S. mutans* la enzima funciona mejor frente a un pH externo inferior y posiblemente presenta

niveles globales más altos de actividad, con respecto a *S. sanguinis*. Entonces *S. mutans* presentaría competencia frente a *S. sanguinis* con respecto al enzima ATP-F, regulando la actividad a valores superiores de acidificación.

En *S. sanguinis* SK36 se encontró un grupo de genes codificantes del operón de la enzima ATPasa-V. Usando Artemis se verificó si había la presencia de este grupo de genes en *S. mutans*, sin embargo no están presentes en su genoma. Estudios de ATPasas en estreptococos orales son mínimos, sin embargo hay estudios en otras especies cercanas filogenéticamente. Muller & Gruber, 2003 estudiando las ATPasas-V dan a conocer que funcionan en una variedad de procesos fisiológicos. En células eucariotas se ubican dentro de membranas de compartimiento intracelulares que incluyen los endosomas, lisosomas y vesículas secretorias, además se encuentran en arqueas y en algunas bacterias. Las ATPasas-V comparten un andamio general con las ATPasas-F, pero se diferencian de estas en aspectos estructurales y funcionales.

Hilario & Gogarten, 1993 indican que la presencia de ATPasas-V en varios linajes bacterianos y la presencia de ATPasas-F en dos especies de arqueas del género *Methanosarcina*, se especula que es consecuencia de la transferencia genética horizontal (HTG) extensa de los respectivos genes entre los dos dominios (Archea-Bacteria). De este modo podría haber ocurrido la transferencia genética, del sistema de ATPasa-V que bombea  $\text{Na}^+$  en *Enterococcus hirae*. Es el primer caso de transferencia horizontal de una porción grande del genoma, lo que podría ser consecuencia de una endosimbiosis con otro microorganismo.

Por lo tanto se sugiere que *S. sanguinis* SK36 posiblemente adquirió material genético (genes de la enzima ATPasas-V) a través de evento de transformación genética horizontal (HTG). La enzima podría provenir de estreptococos del grupo mitis o de otros géneros. Se buscó mediante el programa BlastP (Figura 12) con que organismos la enzima ATPasa-V presentaba la mayor identidad con relación a su secuencia de aminoácidos resultando ortólogos con identidad del 98-90% con *S. gordonii*, *S. gallolyticus*, *S. pneumoniae*, *S. faecium* y además *S. parasanguis*, *S. intermedius*, *S. australis*. Esto sugiere

que el grupo de genes codificante del enzima ATP-V provienen posiblemente de una de estas especies de estreptococos.

Estudios realizados por Konings, 2006 y; Von Ballmoos & Dimroth, 2007, indican que la capacidad de algunos procariotas de utilizar el gradiente de sodio para la síntesis de ATP, ha sido una adaptación para la supervivencia en condiciones de ambientes extremos. El ciclo del  $\text{Na}^+$  es un vestigio evolutivo que ha sido preservado por selección natural en un limitado grupo de microorganismos fermentativos, los cuales incluyen a algunos importantes patógenos humanos. Se propone que la enzima ATPasa-V encontrado en el genoma de *S. sanguinis* SK36, podría utilizar el gradiente de  $\text{Na}^+$  para obtener ATP proveniente de la actividad ATP-V y sobrevivir en un ambiente hostil como el biofilm dental.

La pérdida de la actividad ATPasa-V en células, afecta en varios procesos fisiológicos, por lo tanto las ATPasas-V pueden servir como dianas para el desarrollo de fármacos, esto es importante para la investigación de mecanismos inhibitorios en la enzima ATPasa-V. Se ha demostrado en estudios por Takeda *et al.*, 2009 que el cloruro de tributiltina detiene un paso elemental para la catálisis de rotación conducido por una ATPasa-V. Según lo descrito anteriormente la enzima ATPasa-V presente en *S. sanguinis* SK36 sería un excelente blanco potencial para el desarrollo de fármacos e inhibir su función, esta bacteria además de ser beneficioso en la placa dental es un patógeno oportunista que produce endocarditis infecciosa de las válvulas del corazón.

La proteína CcpA, es miembro de la familia de reguladores transcripcionales *Lacl*. CcpA es un regulador global del metabolismo del azúcar y represión catabólica de carbono en bacterias grampositivas. Durante la represión del catabolismo, *CcpA* reprime las vías metabólicas que no son requeridas cuando alguna fuente de carbohidrato está presente en el ambiente. (Warner & Lolkema, 2003). En el estudio se encontró que la proteína CcpA presente en el genoma de *S. sanguinis* y *S. mutans* comparten identidad del 78.40%, sugiriendo que esta proteína es altamente conservada en el linaje. Según el análisis (Figura 13) muestra que las secuencias de CcpA son altamente conservadas en el género

*Streptococcus* presentando el dominio HTH para anclarse al ADN. Según Zheng *et al.*, 2012 CcpA es esencial en el metabolismo global como el principal regulador de represión catabólica por carbono (CCR) en bacterias grampositivas y además participa en la regulación de las propiedades de virulencia.

En el análisis según la BD Regprecise utilizada para la predicción de sitios de regulación. Los sitios *cre* son secuencias de nucleótidos reconocidos por CcpA (Tabla 04). Se encontró que CcpA podría regular la categoría [G] del metabolismo y transporte de carbohidratos. *S. sanguinis* y *S. mutans* comparten 20 genes comunes y 58 genes exclusivamente de *S. sanguinis* y 8 genes únicamente en *S. mutans*. Esta categoría funcional es metabólicamente relevante para el crecimiento de *S. sanguinis* y *S. mutans* dentro del biofilm dental debido a que su nutrición se basa en diferentes tipos de carbohidratos.

Además CcpA también regularía 15 genes en *S. sanguinis* involucrados en el metabolismo y transporte de aminoácidos [E] esencial para su metabolismo nutricional. Los resultados arrojados en este análisis a través de la BD Regprecise coinciden con los encontrados por Carvalho, *et al.*, (2012) mediante estudios de microarreglos. En un  $\Delta$ CcpA en *S. pneumoniae* encontró, que el mayor número de genes influenciados por CcpA es la categoría del transporte y metabolismo de carbohidratos [G], con genes principalmente reprimidos por CcpA. Además, la categoría [K] de transcripción con 21 genes codificantes de posibles reguladores de transcripción. CcpA estaría implicado en diversos procesos celulares conectado a la virulencia y patogénesis.

En los resultados (Figura 14) mediante análisis con las BDs Regprecise, Microbes Online y KEEG, en *S. sanguinis* y *S. mutans* se presentan genes involucrados en las principales vías energéticas como el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, metabolismo de nucleótidos, sistema de transportadores tipo ABC, sistema de transporte PTS, ATPasas-F, reguladores transcripcionales y otras proteínas hipotéticas (sin función conocida). *S. sanguinis* además presenta genes involucrados en 3 vías metabólicas diferentes que no están reguladas por CcpA en *S. mutans* siendo el metabolismo de los

glicerofosfolípidos, metabolismo de arginina y prolina, metabolismo de glicina, serina y treonina y el gen *spxB* que codifica para piruvato oxidasa fundamental en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estos datos se correlacionan en gran parte con los que encontraron por Carvalho *et al.*, (2012) estudiando a *S. pneumoniae*. A través del análisis del transcriptoma de *S. pneumoniae* se conoció experimentalmente que CcpA regula genes involucrados la vía de Embden Meyerhof – Parnas (Glucólisis), la vía de metabolismo del piruvato, pero además se encontraron otras vías propias de *S. pneumoniae* como algunos genes involucrados en la biosíntesis de la cápsula, fosforilcolina y vía del peptidoglicano. Shelburne *et al.*, (2008) indican que CcpA regula a nivel de la transcripción un alto porcentaje de genes en *Streptococcus mutans* (9%), *Streptococcus pyogenes* (20%) y *S. pneumoniae* (19%). A pesar de su relación como organismos ortólogos aparentemente estas especies de *Streptococcus* han desarrollado distintas redes reguladoras mediadas por CcpA.

Zheng *et al.*, 2012 trabajaron en un  $\Delta$  CcpA de *S. gordonii*. Dicho mutante redujo de 9 a 17 veces la expresión génica de competencia cuando se comparó con la cepa silvestre. Además indican que los genes *comCDE* involucrados en la competencia no presentan sitios de unión en sus promotores para CcpA, lo cual sugiere que el efecto observado es indirecto. Probablemente CcpA regula la expresión de otros reguladores transcripcionales de competencia. Según el estudio anterior CcpA influye en la competencia, por lo tanto se indica que CcpA en *S. sanguinis* y *S. mutans* podrían realizar funciones similares, debido a que son evolutivamente cercanos con respecto a *S. gordonii* (Figura 14).

Abranches *et al.*, 2008 estudiaron un  $\Delta$  CcpA de *S. mutans* que creció en presencia de glucosa, resultand disminución significativa en la expresión de genes codificantes de enzimas como ATPasa-F, fosfoglicerato quinasa (P<sub>gk</sub>), y fructosiltransferasa (*ftf*). La tolerancia al ácido dependiente de la enzima ATPasa, producción de ácido a partir de carbohidratos (P<sub>gk</sub>), y producción de glucanos y fructanos (G<sub>tf</sub> y F<sub>tf</sub>), así como la capacidad para el transporte de carbohidratos (PTS) y producir compuestos intracelulares de almacenamiento (glucógeno), son procesos fundamentales para el potencial patogénico de *S. mutans*. CcpA representa un punto de control importante para la expresión de patrones críticos de virulencia en células bacterianas que crecen en glucosa. Estos datos del  $\Delta$ CcpA coinciden en gran parte con los datos representados (Figura 14) de los genes regulados por CcpA encontrados *in silico* en *S. mutans* y *S. sanguinis*. La BD *Regprecise* es de notable apoyo en la tesis, al predecir genes regulados por CcpA, lo que permitió dilucidar potenciales genes componentes de vías metabólicas esenciales para *S. sanguinis* y *S. mutans*. Sin embargo habrá que validar experimentalmente (microarreglos) en qué condiciones fisiológicas podrían activarse o reprimirse determinados grupos de genes, en presencia de diferentes tipos de azúcares usados en la nutrición de estos microorganismos.

Las bacteriocinas son toxinas proteicas encontrados en los principales linajes de bacterias, estas inhiben el crecimiento de organismos relacionados (Cleveland *et al.*, 2001 en Merritt & Qi, 2012). Muchas bacterias grampositivas producen péptidos antimicrobianos (bacteriocinas). Aunque estos péptidos no son requeridos para el crecimiento estos podrían ayudar al microorganismo que los produce a competir por nutrientes limitados en su ambiente (Merritt & Qi, 2012). Mediante BlastP se buscó (Tabla 05) ortólogos a la proteína *sgc* (SGO0566) de *S. gordonii* Challis. Se encontró a PrtS (SSA1882) en *S. sanguinis* que presenta identidad del 76% y en *S. mitis* por encima del 50%, presentando dominios característicos de PrtS de *S. sanguinis*. En el estudio de Wang & Kuramitsu, 2004 identificaron un gen que codifica una serin proteasa en el genoma de *S. gordonii* (Challis).

El gen *sgc* codifica una proteína Challisina, que presenta actividad antimicrobiana esta inactiva completamente la expresión de los péptidos estimulantes de la competencia (CSP) en *S. mutans*. Los CSP regulan la expresión de los genes que codifican bacteriocinas, por lo tanto se podría evaluar experimentalmente la actividad serin proteasa (PrtS) de *S. sanguinis* frente a CSP de *S. mutans* y ser usado para conocer su actividad biológica en futuros trabajos.

En un estudio de Geng *et al.*, (2012) quienes reportan la presencia de 3 proteínas (Spaf\_0194, Spaf\_1710 y Spaf\_1711) en el genoma de *S. parasanguinis*, proteasas de la familia subtilisina. Estas proteasas interfieren con la colonización de *S. mutans* en un sistema de biopelícula por la inactivación de péptidos estimulantes de competencia (CSP). Por lo tanto, la expresión óptima de serin proteasa de *S. sanguinis* podría proporcionarle una ventaja competitiva en la etapa de crecimiento frente a otras especies en el complejo ecosistema oral. Esta serin proteasa de *S. parasanguinis* comparte una identidad del 60% y e-value de 0.0, con respecto a *S. sanguinis*, siendo valores significativos.

Los estreptococos utilizados (Tabla 05) para analizar la secuencia de serin proteasa son colonizadores de distintas cavidades, *S. thermophilus* no habita la cavidad oral; sin embargo, se presenta como uno de los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal en lactantes. *S. suis* es una bacteria encontrada en animales (cerdo) y produce una enfermedad zoonótica que afecta al hombre y *S. gallolyticus*, se encuentra colonizando el colon de *H. sapiens* y está asociado con diversas enfermedades.

La producción de mutacinas probablemente juega un papel fundamental en la supervivencia de *S. mutans*. Las mutacinas ayudan a competir con estreptococos primarios del biofilm dental permitiendo que se establezcan o se mantenga la colonización de la superficie del diente (Kuramitsu *et al.*, 2007). Por otro lado, debido a que la cavidad oral es una de las principales puertas de entrada para patógenos humanos, es comprensible que la producción de mutacinas podría desempeñar un papel importante en la protección del huésped debido a infecciones perjudiciales, similares a las observaciones hechas con otros estreptococos orales. (Merritt & Qi, 2012).

Las principales clases de mutacinas son (lantibióticos y no lantibióticos). La mutacina lantibiótico tiende a tener un amplio espectro de actividad contra las bacterias grampositivas incluyendo cepas de *S. mutans*, mientras que la no-lantibiótico ha demostrado ser principalmente activas contra especies estrechamente relacionadas. Esta estructura inusual es resultado de una extensa modificación post-traducciona del pre-péptido y son cruciales para la actividad inhibidora de la bacteriocina. También confieren gran estabilidad al péptido debido que es resistente a la inactivación frente a una amplia gama de condiciones ambientales extremas. Los lantibióticos son conocidos como bacteriocinas de clase I, basadas en su estructura terciaria, los lantibióticos se clasifican en tipo A (lineal) o en tipo B (globular) (Jung, 1991 en Merritt & Qi, 2012).

Por lo general, las distintas cepas de *S. mutans* codifican múltiples genes de mutacinas no lantibióticos, estas no presentan modificación post-traducciona y los espectros antimicrobianos son mucho más estrechos que las mutacinas lantibiótico. Por ejemplo, mutacina IV es activa contra numerosas especies de estreptococos, pero es inactivo contra cepas de *S. mutans*, estafilococos o enterococos (Qi *et al.*, 2001). Nes *et al.*, 1996 quienes indican los rasgos característicos para identificar potenciales mutacinas en el genoma de *S. mutans* es la presencia de un péptido líder, región que termina en motivo de doble glicina (-GG-). Además el péptido líder se transforma en pre-péptido y se exporta a través del transportador ABC que está unido a la membrana, responsable de la secreción de péptido y escindir la secuencia líder en el sitio de procesamiento GG, por lo tanto con este criterio de análisis se encontró 14 potenciales bacteriocinas (Tabla 07) que presentaron el dominio -GG- en el genoma de *S. mutans* UA159.

Las feromonas peptídicas utilizan mecanismos de secreción similares al péptido estimulante de la competencia (comC) de *S. mutans*. A diferencia de la mutacina lantibiótico, los genes (pre-péptido y transportador ABC) para la producción de mutacinas no lantibióticos no pueden ser localizados dentro del mismo grupo de genes. El transportador ABC podría ser responsable de secretar múltiples mutacinas no lantibiótico (Hale *et al.*, 2005). De las 14 mutacinas (Tabla 07) según el análisis smu.1895c, smu.1902 y

smu1903, presentan significativa homología al péptido comC, según los valores del servidor CELLO, son proteínas de localización citoplasmática.

Por lo tanto *S. mutans* podría tener más de un péptido estimulante de la competencia (CSP), para activar la transcripción de mutacinas. Zeng L. *et al.*, (2013) encontraron en un estudio dos grupos de genes que son regulados por glucosa, smu.150, smu.153 que codifican bacteriocinas (mutacina IV) capaz de matar estreptococos orales estrechamente relacionados y el grupo de genes smu.1898, 1914 incluye dos supuestos transportadores tipo ABC, además una supuesta proteína de secreción de bacteriocina (SMU.1905c), una proteína relacionada con bacteriocina (smu.1906c) y una proteína de inmunidad bacteriocina (smu.1913c). Las bacteriocinas reportadas coinciden según Tabla 07, por lo tanto las 7 bacteriocinas restantes encontradas son candidatas para estudiar su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a estreptococos.

En conclusión general estos resultados demostrarían que la competencia y coexistencia de *S. sanguinis* no es únicamente por la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producto de su metabolismo fermentativo. Además su genoma codifica un complejo arsenal de proteínas las cuales le confieren cierta ventaja encontrando, el enzima glutatión peroxidasa, con actividad protectora frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el complejo enzimático ATPasa-V podría regular el pH ácido del medio, proteínas Com del sistema de *Quórum sensing* para captación de ADN y adquirir nuevos genes a través de la transferencia genética horizontal y la proteína PrtS con actividad serin proteasa, con posible actividad proteolítica. Sin embargo el genoma de *S. mutans* presenta también un complejo arsenal de bacteriocinas (mutacinas). Se propone que estas proteínas encontradas en cada especie podrían ser utilizadas para sobrevivir en el estresante ambiente del biofilm dental. Estas proteínas fueron las más relevantes en el estudio y podrían proporcionar alguna capacidad para competir y coexistir ecológicamente en cada especie y relacionarse entre bacterias interespecíficas competidoras dentro de la biopelícula dental.

## VI. CONCLUSIONES.

- Se caracterizó la información del genoma de *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159, mediante el análisis de 22 categorías funcionales COGs siendo [E] Metabolismo y transporte de aminoácidos, [G] Metabolismo y transporte de carbohidratos, [P] Metabolismo y transporte de iones inorgánicos, las categorías funcionales que presentan un mayor número de proteínas involucrados, según su característico metabolismo nutricional dentro del biofilm dental.
- Se identificó rutas metabólicas completas específicas de *S. sanguinis* SK36 como degradación de histidina, biosíntesis de esfingolípidos y metabolismo de porfirinas. *S. mutans* UA159, presenta enzimas específicas en rutas metabólicas incompletas como ciclo de Krebs, degradación de glutamina, síntesis del almidón, sin embargo no son relevantes en la competencia.
- Se describió el modelo de señalización celular, específicamente el sistema de *Quórum sensing* encontrado en *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159, en base a proteínas ortólogas analizadas y a literatura científica en el servidor Pubmed con valores significantes en especies cercanas filogenéticamente al género *Streptococcus*.
- Se realizó la comparación de proteínas con significancia siendo las proteínas del complejo enzimático ATP-V, complejo proteico *com* (QS) y la enzima glutatión peroxidasa las implicadas en la competencia y la proteína ptrS con actividad proteasa, las mutacinas, el regulador CcpA y las ATPasa-F las implicadas en la coexistencia entre ambos microorganismos.

## VII. RECOMENDACIONES.

El modelo predictivo *in silico* acerca de la competencia y coexistencia entre *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans* se ha realizado pretendiendo crear un marco de trabajo inicial lo suficientemente útil para dirigir la investigación de futuros procesos de validación experimentales y se recomienda:

### Recomendación General:

- Corroborar los estudios teóricos realizados en esta tesis a través herramientas de biología molecular haciendo énfasis en la generación de mutantes de *S. sanguinis* y *S. mutans* de las principales proteínas que permitan establecer la competencia entre ambas especies, con énfasis en aquellas de interés en Biomedicina oral.

### Recomendaciones Específicas:

- Realizar un microarreglo del mutante CcpA de *S. sanguinis* SK36, para conocer toda la red de genes regulados en condiciones de estrés.
- Realizar knockout del gen que codifica la posible enzima glutatión peroxidasa en *S. sanguinis* SK36, para determinar si esta proteína participa en la virulencia o en la protección contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el biofilm dental.
- Caracterizar molecularmente las proteínas que codifican el posible complejo enzimático ATPasa-V.
- Caracterizar molecularmente la proteína prtS que codifica la posible serina proteasa presente en *S. sanguinis* SK36, purificar y evaluar su actividad proteolítica en condiciones *in vitro*.
- Caracterizar molecularmente los genes que codifican el posible sistema de competencia genética en *S. sanguinis* SK36.

## VIII. GLOSARIO

**Bioinformática:** Uso de herramientas computacionales para analizar, predecir y acceder a secuencias de ADN, proteínas y ARN (Madigan *et al.*, 2003).

**Biofilm:** Colonia de células microbianas recubiertas o incluidas en sustancias mucosas y adheridas a una superficie (Madigan *et al.*, 2003).

**Genoma:** Todos los genes de una célula o virus (Madigan *et al.*, 2003).

**Genómica:** Disciplina que involucra el mapeo, secuenciación y análisis de genomas (Madigan *et al.*, 2003).

**In silico:** Uso de herramientas computacionales para análisis sofisticados (Madigan *et al.*, 2003).

**Ortólogos:** Genes que se encuentran en un organismo y que son similares a los de otro organismo pero que difieren por el propio proceso de especiación (Madigan *et al.*, 2003).

**Operón:** Uno o más genes transcritos en un único ARN bajo el control de un único sitio regulador (Madigan *et al.*, 2003).

**Parálogos:** Genes de un organismo cuya similitud es el resultado de una duplicación génica en algún punto de la evolución del organismo (Madigan *et al.*, 2003).

**Quórum sensing:** Rutas reguladoras de bacterias que responden a la densidad poblacional (Madigan *et al.*, 2003).

**ARNr 16S:** Un polinucleótido grande (~1500pb) que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas y de cuya secuencia puede obtenerse información evolutiva (Madigan *et al.*, 2003).

**Sistema de dos componentes:** Sistema regulador que contiene una proteína quinasa sensora y una proteína reguladora de la respuesta (Madigan *et al.*, 2003).

## IX. RESUMEN

La caries dental es una de las enfermedades más comunes en el ser humano, es un problema que afecta la calidad de vida de las personas y demanda altos recursos de parte de los servicios de salud. Con el fin de disminuir la caries, una mejor comprensión del papel patogénico de los microorganismos en las enfermedades dentales es necesaria. Estudios permiten conocer los organismos involucrados en la coexistencia y el antagonismo, *S. sanguinis*, es un colonizador primario este produce cantidades de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) que inhiben el crecimiento de *S. mutans* y este produce péptidos antimicrobianos (mutacinas) estos péptidos podrían jugar un papel en la competencia contra *S. sanguinis*. El objetivo de la presente investigación fue predecir cuál es modelo metabólico general de la competencia y coexistencia entre *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159 en el biofilm dental. Se analizaron dos genomas mediante herramientas bioinformáticas. Los resultados demuestran que la competencia y coexistencia no es únicamente por la producción de  $H_2O_2$  en *S. sanguinis*, sino que además su genoma codifica un complejo arsenal de proteínas las cuales les podrían dar ventajas encontrando las proteínas del complejo enzimático ATPasa-V, complejo proteico *com* (QS) y la enzima glutatión peroxidasa las implicadas en la competencia y la proteína ptrS con actividad proteasa, las mutacinas, el regulador CcpA y las ATPasa-F las implicadas en la coexistencia entre ambos microorganismos. Estas podrían ser las posibles proteínas que proporcionen ventaja ecológica inusual respectivamente en cada microorganismo, para sobrevivir en el estresante y fluctuante ambiente del biofilm dental. El modelo predictivo *in silico* acerca de la competencia y coexistencia se ha realizado pretendiendo crear un marco inicial de trabajo lo suficientemente útil para dirigir la investigación de futuros procesos de validación experimental.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J., Paster, B., Stokes, L., Olsen, I., Dewhirst, F. (2005) Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5721-5732.
- Abranches, J., Nascimento, M., Zeng, L., Browngardt, C., Wen, Z., et al. (2008). CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 190, 2340–2349.
- Ajdic, D., et al. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*.99,14434–14439.
- Altschul, S., Madden, T., Schaler, A., Zhang, J., Zheng, Z., Miller, W., Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST – A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- Arenas, F., Díaz, W., Leal, C. Pérez-Donoso, J., Imlay, J. & Vásquez, C. (2010). The *Escherichia coli* BluE gene, encode a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 398(4), 690-694.
- Bailey, T. & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers., *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36.
- Banas, J. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 9, 1267–1277.
- Barthelme, J., Ebeling, C., Chang, A., Schomburg, I. and Schomburg, D. (2007). BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007. *Nucleic Acids Res.* 35, D511-D514.
- Barnard, J., and Stinson, M. (1996). The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infection and Immunity.* 64, 3853- 7.
- Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2,582–587.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S., Griffiths-Jones, S., Howe, K., Marshall, M., Sonnhammer, E. (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 30, 276-280.
- Becker, M., Paster, B., Leys, E., et al. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40, 1001–1009.
- Brenot, A., King, K., Janowiak, B., et al. (2004). Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun* 72,408–413.
- Carvalho, S., Kloosterman, T., Kuipers, O., Neves, A. (2011) CcpA Ensures Optimal Metabolic Fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE.* 6(10).e26707.
- Caufield, P., Dasanayake, A., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J. and Hardin, J. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 68, 4018–4023.

- Chain, P., Kurtz, S., Ohlebusch, E. and Slezak, T. (2003). An applications-focused review of comparative genomics tools: capabilities, limitations and future challenges. *Brief Bioinform* 4, 105–123.
- Cvitkovitch, D.G. (2001). Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12,217–243.
- Cvitkovitch, D., Li, Y. H. and Ellen, R. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *J. Clin. Investig.* 112, 1626– 1632.
- Darling, A., Mau, B., Blattner, R. and Perna, N.(2003). MAUVE: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements. *Genome Research* 14(7), 1394- 1403.
- Dehal, P., Joachimiak, M., Price, M., Bates, J., Baumohl, J., Chivian, D., Friedland, G. et al (2009). MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids research.* 1, 5.
- Deng, H., Ding, Y., Fu, M., et al. (2004). Purification and characterization of sanguicin - a bacteriocin produced by *Streptococcus sanguis*. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 35, 555–558.
- Diaz, P., Chalmers, N., Rickard, A., Kong, C., Milburn, C., Palmer, R., Kolenbrander ,P.(2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and environmental microbiology.* 72, 2837–2848.
- Fatumo S., Plaimas K., Mallm J., Schramm G., Adebisi E., Oswald M., Eils R., König R. (2009). Estimating novel potential drug targets of *Plasmodium falciparum* by analysing the metabolic network of knock-out strains *in silico*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(3), 351-358.
- Fink, R.C. & Scandalios, J.G. (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys* 399, 19–36.
- Fitzgerald, R. and Keyes, P. (1960). Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 61, 9-33.
- Ge, X., Kitten, T., Chen, Z., Lee, S., Munro, C. and Xu, P. (2008). Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect. Immun.* 76, 2551–2559.
- Ge, Y., Caufield, P., Fisch, G., Li, Y. (2008). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Colonization Correlated with Caries experience in children. *Caries Res.* 42, 444-448.
- Geng, J., Chiu, C., Tang, P., Chen, Y., Shieh, H., Hu, S., & Chen, Y. (2012). Complete Genome and Transcriptomes of *Streptococcus parasanguinis* FW213: Phylogenetic Relations and Potential Virulence Mechanisms. *PLoS ONE* 7(4): e34769.
- Gilmore, K., Srinivas, P., Akins, D., Hatter K., and Gilmore, M. (2003). Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect. Immun.* 71, 4759–4766.
- Gorke, B. & Stulke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6, 613–624.

- Hale, J., Ting, Y., Jack, R., Tagg, J. & Heng, N. (2005). Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71,7613–7617.
- Havarstein, L., Coomaraswamy, G. and Morrison, D. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 11140–11144.
- Hilario, E. & Gogarten, J. (1993). Horizontal transfer of ATPase genes-the tree of life becomes a net of life. *Biosystems.*31, 111-119.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 215-219.
- Hui, F. and Morrison, D. (1991). Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows comA, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J Bacteriol*173, 372–381.
- Johnsborg, O. and Havarstein, L. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* 33, 627–642.
- Jones, D.(1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292, 195-202.
- Kanehisa, M., Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M. and Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 34, D354-D357.
- Karp, P., Riley, M., Paley, S., Pellegrini-Toole, A. (2002). The MetaCyc database. *Nucleic Acids Res.* 30, 59-61.
- Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F. Miura, H. and Ezaki, T. (1995). Determination of 16s rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus Streptococcus. *IJSB*, 45. (2), 406-408
- Kilic, A., Tao, L., Zhang, Y., Lei, Y., Khammanivong, A. and Herzberg, M.(2004). Involvement of *Streptococcus gordonii*  $\beta$ -glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and in vivo gene expression.*J. Bacteriol.* 186,4246–4253.
- Kleerebezem, M., Quadri, L., Kuipers, O. and M. de Vos, W. (1997). *Quorum sensing* by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24,895–904.
- Kleerebezem, M., & Quadri, L.E. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides.* 22,1579–1596.
- Konings, W. (2006). Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 325–342.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. and Qi, F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 187, 7193–7203.

- Kreth, J., Zhang, Y., and Herzberg, M. (2008) Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*. 190, 4632–4640.
- Kreth, J., Vu, H., Zhang, Y. and Herzberg, M. (2009). Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal Bacteriology*. 191, 6281–6291.
- Krogh, A., Larsson, B., vonHeijne, G., Sonnhammer, E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305, 567-580.
- Kuboniwa, M., Tribble, G., James, C., Kilic, A., Tao, L., Herzberg, M., Shizukuishi, S. and Lamont, R. (2006). *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol. Microbiol.* 60, 121–139.
- Kuhnert, W., & Quivey, J. (2003). Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from *Streptococcus sanguis* 10904. *J Bacteriol.* 185(5):1525-33.
- Kuramitsu, H. (1993). Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4, 159–176.
- Kuramitsu, H., He, X., Lux, R., Anderson, M. and Shi, W. (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71, 653–670.
- Lee, M.S., & Morrison, D.A. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* 181, 5004–5016.
- Li, Y.H., Lau, P., Tang, N., Svensater, G., Ellen, R. and Cvitkovitch, D. (2002a). Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 184, 6333–6342.
- Li, Y., Tang, N., Aspiras, M. & Cols. (2002b). A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol* 184, 2699–2708.
- Lin, I-H., Liu, T-T., Teng, Y-T., Wu, H-L., Liu, Y-M., *et al.* (2011). Sequencing and Comparative Genome Analysis of Two Pathogenic *Streptococcus gallolyticus* Subspecies: Genome Plasticity, Adaptation and Virulence. *PLoS ONE* 6(5): e20519.
- Loesche, W. (1982). *Dental caries: A treatable infection*. Illinois: Charles C Thomas, 1-558.
- Loesche, W. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 50, 353-380.
- Loo, C., Corliss, D. and Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 182, 1374–1382.
- Loo, C., Mitrakul, K., Voss, I., Hughes, C. and Ganeshkumar, N. (2003). Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 185, 6241–6254.
- Lulko, A., Buist, G., Kok, J. and Kuipers, O. (2007). Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12, 82–95.

- Lunsford, R. & Roble, A.(1997). ComYA, a gene similar to comGA of *Bacillus subtilis*, is essential for competence-factor-dependent DNA transformation in *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol.*179 (10), 3122-6.
- MacDonald, J. (1962). Microbiology of Caries. In: Sognaes, R., ed. : Chemistry and the prevention of Dental Caries. C. C. Thomas, Springfield, Ill, 89-25.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. Novena edición. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. 1046- 1059 pp.
- MaGe (2006). A microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res.* 34,(1) 53-65.
- Marsh, P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology-Sgm.* 149, 279-294.
- Maruyama, F., Kobata, M., Kurokawa, K., Nishida, K., Sakurai, A., Nakano, K., *et al.* (2009).Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics*, 10,358.
- Mayooran, B.,Robin, S. and John, R.(2000).Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust. Dent. J.* 45, 235-245.
- Merritt, J., Zheng, L., Shi, W, & Qi, F. (2007) Genetic characterization of the *hdrRM* operon: a novel high-cell-density-responsive regulator in *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 153, 2765–2773.
- Merritt, J. & Qi, F. (2012).The mutacins of *Streptococcus mutans*: Regulation and ecology. *Molecular Oral Microbiology* 27, 57-69.
- Milne, C., Pan- Jun, k., James, E. and Nathan, P. (2009). Accomplishments in genome-scale in silico modeling for industrial and medical biotechnology. *Biotechnol J.* 4(12), 1653- 1670.
- Ministerio de Salud del Perú (MINSA), (2012). Recuperado de: [http://www.minsa.gob.pe/portada/est\\_san/saludbucal.htm](http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm). Consultado en mayo, 2012.
- Morrison, D. (1997) Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb Drug Resist* 3, 27–37.
- Mouton, C.and Robert, J.(1995). Bacterias grampositivas. In: Mouton, C., Robert, J. *Bacteriología bucodental.* Barcelona: Masson 5, 73-90.
- Muller, V. & Gruber, G. (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 474–494.
- Munson, M., Banerjee, T., Watson and Wade, G.(2004).Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *Journal of clinical microbiology.* 42, 3023-3029.
- Nakai, K., and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 24, 34-36.
- Nes, I., Diep, D. & Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189, 1189–1198.

- Nishi, T. & Forgac, M. (2002). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases - Nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 94–103.
- Nobbs, A., Vajna, R., Johnson, J., Zhang, Y., Erlandsen, S., Oli, M., Kreth, J., Brady, L. and Herzberg, M. (2007). Consequences of a sortase A mutation in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 153, 4088–4097.
- Nobbs, A.H. , Lamont, R.J. , Jenkinson H.F. (2009) *Streptococcus* Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 73, 407- 450.
- Nobrega, M. and Pennacchio, L. (2003). Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *J Physiol* 554, 31-39.
- Pestova, E., Havarstein, L. and Morrison, D. (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* 21, 853–862.
- Petersen, T., Brunak, S., von Heijne G. and Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785-786.
- Qi, F., Chen, P. and Caufield, P. (2001). The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a non lantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 15–21.
- Ramos-Montañez, S., Tsui, H. C., Wayne, K. J., Morris, J. L., Peters, L. E., Zhang, F., Kazmierczak, K. M., Sham, L. T. and Winkler, M. E. (2008). Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (*SpxR*) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 67, 729–746.
- Roberts S., Mazurie A., Buck G. Integrating genome-scale data for gene essentiality prediction. (2007.) *Chemistry & Biodiversity*, 4(11), 2618-2630.
- Rodríguez, A., Callahan, J., Fawcett, P., Ge, P., Xu, P. & Kitten, T. (2011). Physiological and molecular characterization of genetic competence in *Streptococcus sanguinis*. *Mol Oral Microbiol.* 26(2), 99–116.
- Rodríguez, C., Delgado, M. (2006). Vigilancia y evolución de la salud. Método de observación y control. Vol. 32(1).
- Rosan, B. & Lamont, R. (2000). Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2, 1599-1607.
- Rolerson, E., Swick, A., Newlon, L., Palmer, C., Pan, Y., Keeshan, B. and Spatafora, G. (2006). The SloR/Dlg metallo regulator modulates *Streptococcus mutans* virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 188, 5033–5044.
- Sakamoto, M., Umeda, M., Benno, Y. (2005). Molecular analysis of human oral microbiota. *J. Periodont. Res.* 40, 277-285.
- Sathyanarayanan, R. and Carounnandy, U. (2002). Classification and management of dental caries. New concepts. *Indian J Dent Res.* 13(1), 1-5.
- Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Cha, R. and Moreno-Sánchez, R. (2005). Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*, 272, 1767-1783.

- Senadheera, M., Guggenheim, B., Spatafora, G., Huang, C., Choi, J., et al. (2005). A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J. Bacteriol.* 187, 4064–4076.
- Shelburne, S., Keith, D., Horstmann, N., Sumby, P., Davenport, M., et al. (2008). A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A Streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1698–1703.
- Sherrill, C., & Fahey, R. (1998). Import and Metabolism of Glutathione by *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology.* 180(6), 1454–1459
- Smith A., Quivey, J. & Faustoferri R. (1996). Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* membrane-bound, proton- translocating ATPase operon. *Gene* 183,87–96.
- Socransky, S. and Haffajee, A. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 28, 12–55.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.
- Turner L., Kanamoto, T., Unoki, T., Munro, C., Wu, H., Gatito, T. (2009). Comprehensive evaluation of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored proteins in early infective endocarditis. *Infection and Immunity.* 77, 4966- 75
- Uehara, Y., Agematsu, K., Kikuchi, K., Matsuzaki, S., Imai, S., Takamoto, M., Sugane, K., Sugiura, T., Konishi, Y. et al. (2006). Secretory IgA, salivary peroxidase, and catalase-mediated microbicidal activity during hydrogen peroxide catabolism in viridians streptococci: pathogen coaggregation. *J Infect Dis* 194, 98–107.
- Vadiakas, G. (2008). Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC). *Eur Arch Paediatr Dent* 9, 114-25.
- Valdes, J., Veloso, F., Jedlicki, E. and Holmes, D. (2003). Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analyses. *BMC Genomics* 4, 51.
- Von Ballmoos, C. & Dimroth, P. (2007). Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* 46, 11800–11809.
- Wang, B. & Kuramitsu, H. (2005). Interactions between oral bacteria: Inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1), 354.
- Warner, J. & Lolkema, J. (2003). CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol. Biol Rev* 67, 475–490.
- Ween, O., Gaustad, O., and Havarstein, L.S. (1999). Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 33, 817–827.

- Woodruff, W., Novak, J. and Caufield, P. (1998). Sequence analysis of mutA and mutM genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*. 206, 37-43.
- Xie, H., Cook, G., Costerton, J., Bruce, G., Rose, T. and Lamont, R. (2000). Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 7067–7069.
- Xie, G., Chain, P., Lo, C., Liu K., Gans, J., Merritt, J. and Qi, F. (2010). Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing. *Molecular Oral Microbiology*. 25, 391-405.
- Xu, P., Alves, J., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L., et al. (2007). Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*. 189, 3166.
- Yamaguchi, M., Terao, Y., Ogawa, T., Hamada, S., Kawabata, S. (2006) Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes and Infection* 8, 2791- 6.
- Yu C., Chen, Y., Lu C. and Hwang, J. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 64, 643-651.
- Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A., Ashby M. and Kreth, J. (2011). Catabolite Control Protein A Controls Hydrogen Peroxide Production and Cell Death in *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*. 193, 516–526.
- Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A. Herzberg, M. & Kreth., J. (2012). Ccpa regulates biofilm formation and competence in *Streptococcus gordonii*. *Molecular oral Microbiology*. 27, 83-94.

## ANEXO 01

**Tabla 08.** Tabla general de proteínas analizadas en el presente estudio, con significancia estadística a través del parámetro e-value y % de identidad.

Gen	Posible función	N° EC	Mejor hits /Organismo	% Identidad	E- value	Score	COG	Locus
<i>PPD</i>	Piruvato fosfato diquinasa	2.7.9.1	<i>S. gordonii</i> Challis	81	0	1483	574	ssa1053
<i>PEP</i>	Fosfoenolpiruvato sintasa	2.7.9.2	<i>S. cristatus</i>	94	0	1626	3848	ssa1012
<i>SpxB</i>	Piruvato oxidasa	1.2.3.3	<i>S. pneumoniae</i>	98	0	1193	28	ssa0391
<i>ntpA</i>	ATP-V sintasa A	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	98	0	1201	1155	ssa0091
<i>ntpB</i>	ATP-V sintasa B	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	99	0	946	1156	ssa0092
<i>ntpC</i>	ATP-V sintasa C	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	96	0	668		ssa0088
<i>ntpD</i>	ATP-V sintasa D	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	99	8e -145	413	1394	ssa0093
<i>ntpE</i>	ATP-V sintasa E	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	95	1e -128	371		ssa0087
<i>ntpG</i>	ATP-V sintasa F	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	99	2e -70	216	1436	ssa0089
<i>ntpl</i>	ATP-V sintasa I	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	96	0	1218	1269	ssa0085
<i>ntpK</i>	ATP-V sintasa K	3.6.3.14	<i>S. gordonii</i> Challis CH1	100	6e -104	306		ssa0086
<i>gor</i>	Glutation reductasa	1.8.1.7	<i>S. parasanguinis</i> FW213	83	0	764	1249	ssa1533
<i>basA</i>	Glutation peroxidasa	1.11.1.9	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	64	1e -70	221	386	ssa1523
<i>ccpA</i>	Prot. A control de catabolito		<i>S. pneumoniae</i>	87	0	578	1609	ssa1576
<i>ccpA</i>	Prot. A control de catabolito		<i>S. ratti</i>	93	0	631	1609	smu.1591
<i>comD</i>	Histidina quinasa		<i>S. pneumoniae</i>	45	2e -99	315	2972	ssa2379
<i>comE</i>	proteína reguladora		<i>S. pneumoiae</i>	66	1e -123	363	3279	ssa2378
<i>comX</i>	Regulador transcripcional		<i>S. pneumoniae</i> GA	50	2e -43	151		ssa0016
<i>comFA</i>	Prot. de competencia tardia		<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	71	0	648	4098	ssa1836
<i>CglA</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i> G54	75	3e -171	489	2804	ssa0184
<i>CglB</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i>	69	1e -149	436	1459	ssa0185
<i>comGC</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i> GA	64	1e -34	125	4537	ssa0186
<i>CglD</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i> D39	59	1e -43	150		ssa0187
<i>comEB</i>	Deaminasa		<i>S. pneumoniae</i> GA	87	6e -98	290	2131	ssa1497
<i>comF</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	47	3e -66	214	1040	ssa1835
<i>CeIA</i>	Prot. de competencia		<i>S. pneumoniae</i> TIGR5	50	4e -60	199	1555	ssa0715
<i>comA</i>	Transportador ABC-ATP.		<i>S. ratti</i>	90	0	1387	2274	smu.286
<i>comB</i>	Transportador ABC-ATP.		<i>S. ratti</i>	70	1e -151	430		smu.287
<i>prtS</i>	serin proteasa –Subtilisina		<i>S. gordonii</i> Challis CH1	76	0	2325		ssa1882

**Tabla 09.** Número y porcentaje de genes para las categorías funcionales COGs de *S. sanguinis* SK36 y *S. mutans* UA159.

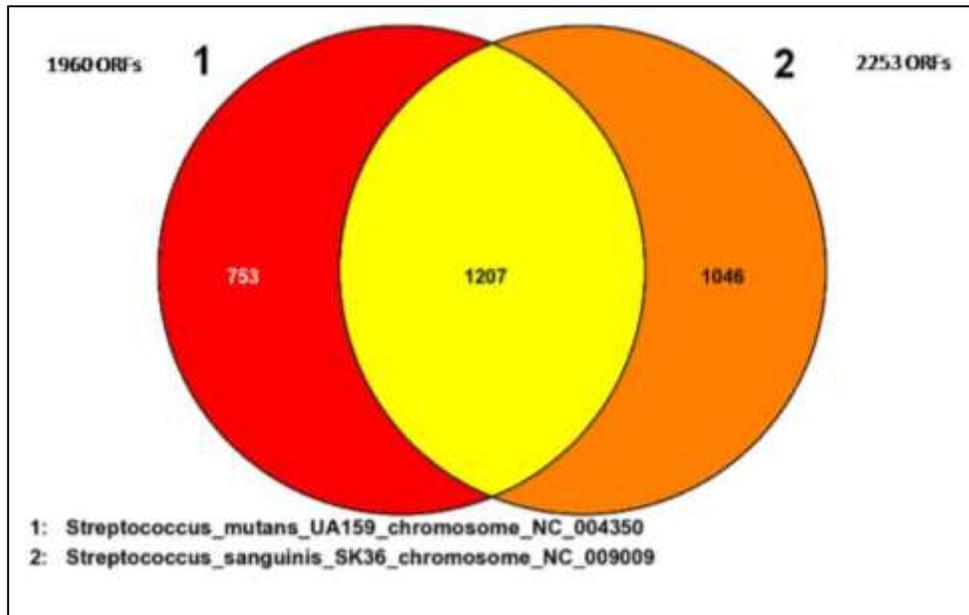
COG <sup>a</sup>	SK36 <sup>b</sup>	SK36 <sup>c</sup>	UA159 <sup>d</sup>	UA159 <sup>e</sup>
[B]	0.04%	1	0.05%	1
[C]	3.87%	92	3.89%	80
[D]	1.60%	38	1.27%	26
[E]	14.75%	351	14.94%	307
[F]	3.82%	91	3.94%	81
[G]	9.12%	217	9.15%	188
[H]	3.57%	85	2.97%	61
[I]	2.56%	61	3.07%	63
[J]	7.48%	178	8.18%	168
[K]	8.32%	198	9.15%	188
[L]	6.60%	157	7.74%	159
[M]	4.92%	117	4.62%	95
[N]	1.89%	45	1.07%	22
[O]	3.28%	78	3.36%	69
[P]	9.37%	223	9.64%	198
[Q]	2.10%	50	1.95%	40
[R]	15.34%	365	15.43%	317
[S]	6.64%	158	6.47%	133
[T]	4.24%	101	4.62%	95
[U]	1.68%	40	1.27%	26
[V]	4.92%	117	5.30%	109
[W]	0.04%	1	0.05%	1

a: categoría funcional COGs

b: COGs en porcentajes de *Streptococcus sanguinis* SK36, c: N° de ORFs en *S. sanguinis*

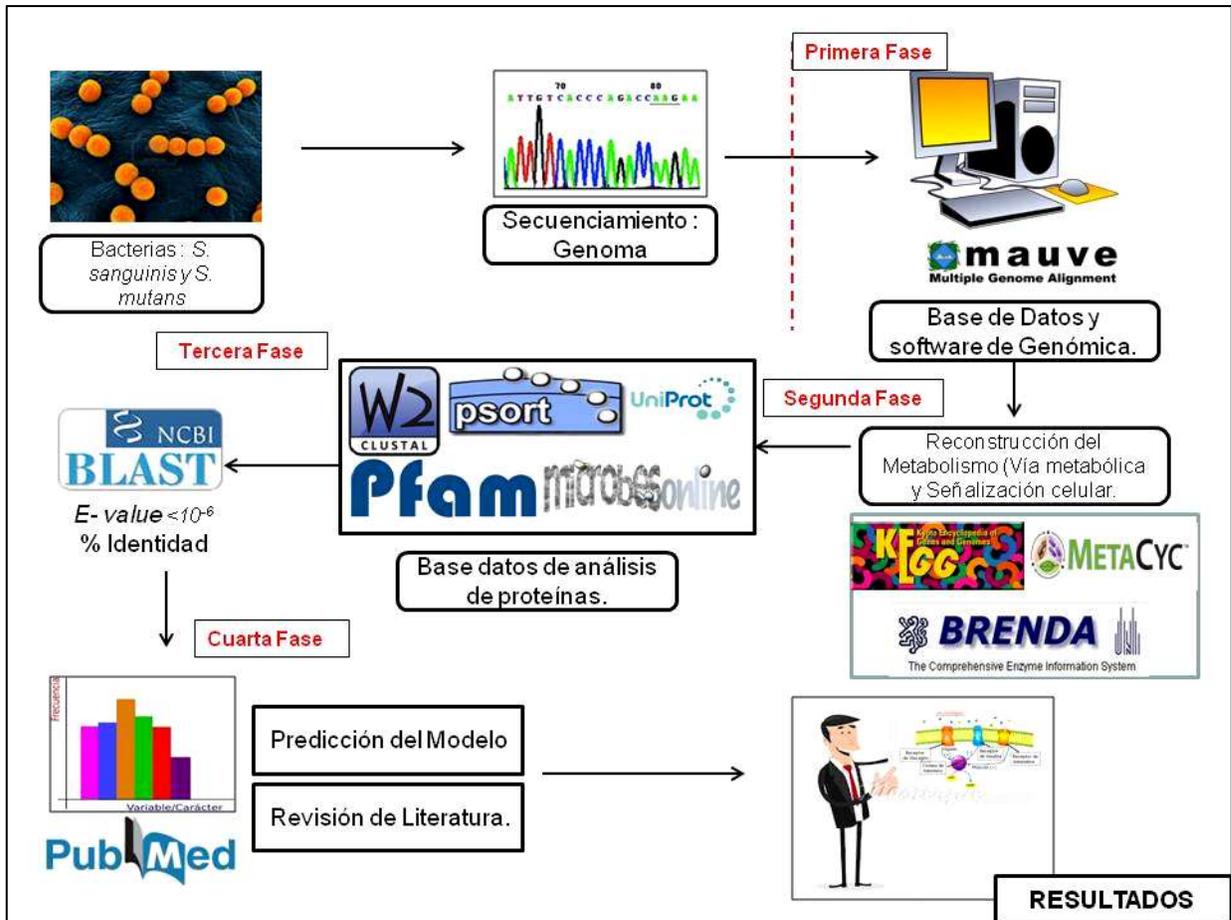
d: COGs en porcentajes de *Streptococcus mutans* UA159, e: N° de ORFs en *S. mutans*

## ANEXO 02



**Figura 16.** Diagrama de Venn. Comparación total de genes (ORFs) entre *S. sanguinis* SK36 que presenta 1960 ORFs y *S. mutans* UA159 presenta 2253 ORFs. Ambas especies comparten 1207 ORFs (ortólogos) comunes en ambas especies con significativo % de identidad. Además *S. mutans* presenta 753 ORFs únicos y *S. sanguinis* 1046 ORFs únicos. Se sugiere que *S. sanguinis* podría tener cierta ventaja genómico evolutiva por presentar una mayor cantidad de genes, los cuales podrían ser usados en ventaja de diferentes procesos metabólicos o biológicos en contra de sus competidores dentro de la cavidad oral, específicamente en el *biofilm* dental.

### ANEXO 03



**Figura 17.** Flujiograma del trabajo bioinformático (análisis *in silico*) el cual comprende cuatro fases detalladas en la metodología del trabajo. Paper base Valdés *et al*, 2003. Se usaron cerca de 13 base de datos de genes, proteínas y genomas de microorganismos.

## ANEXO 04

Lista de web de Base de datos (BD) y softwars utilizados en el estudio bioinformático.

### BASE DE DATOS- BD

- **NCBI:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- **PUBMED:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **BLAST:** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- **MATCHER:** [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_matcher/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/)
- **MicrobesOnline:** <http://www.microbesonline.org/>
- **Regprecise:** <http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/>
- **KEGG:** <http://www.genome.jp/kegg/>
- **MetaCyc:** <http://metacyc.org/>
- **MicroScope:** <http://www.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>
- **BRENDA:** <http://www.brenda-enzymes.org/>
- **CELLO:** <http://cello.life.nctu.edu.tw/>
- **SignalP:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- **TMHMM:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- **Pfam:** <http://pfam.sanger.ac.uk/>
- **MEME:** <http://meme.nbcr.net/meme/> : Motif-based sequence analysis tools

### SOFTWARE:

- **ClustalX:** <http://www.clustal.org/>
- **MEGA:** <http://www.megasoftware.net/>
- **Mauve:** <http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>
- **Artemis:** <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>