

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Odontología

Escuela Profesional de Odontología



**Diseño de una vacuna multiepítopo contra el *S. mutans* utilizando
herramientas computacionales, Arequipa 2024.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Corrales Medina, Rosa Stefany

ORCID: 0009-0001-2694-2384

para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista

Asesor:

Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto

ORCID:0000-0001-6044-1551

Arequipa - Perú

2025

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 30 de Diciembre del 2024

Dictamen: 013214-C-EPO-2024

Visto el borrador del expediente 013214, presentado por:

2019204192 - CORRALES MEDINA ROSA STEFANY

Titulado:

**DISEÑO DE UNA VACUNA MULTIEPÍTOPO CONTRA EL S. MUTANS UTILIZANDO
HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES, AREQUIPA 2024.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**29286016 - ALVARADO ACO ALBERTO ARMANDO
DICTAMINADOR**



**30862017 - FIGUEROA BANDA RUFO ALBERTO
DICTAMINADOR**



**41341691 - LUJAN VALENCIA SARA ANTONIETA
DICTAMINADOR**



Diseño de una vacuna multiepítopo contra el S. mutans utilizando herramientas computacionales, Arequipa 2024.

INFORME DE ORIGINALIDAD

32%

INDICE DE SIMILITUD

28%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

13%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	19%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	4%
3	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	3%
4	dspace.cibnor.mx:8080 Fuente de Internet	2%
5	Submitted to usmp Trabajo del estudiante	1%
6	doi.org Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Leiden University Trabajo del estudiante	1%

DEDICATORIA

La presente tesina está dedicada a

A mis Padres Luis Corrales y Elena Medina porque ellos han sido el motor y ayuda de mis esfuerzos a lo largo de mi vida, su amor incondicional y constante apoyo han sido la brújula que me ha dirigido hacia mis sueños y metas, Además, me han inculcado valores de responsabilidad y perseverancia que han sido esenciales en mi camino hacia el éxito. Son mi mayor fuente de motivación para ser una persona de bien.

Finalmente dedico esta tesis a memoria de mi abuelito Héctor, papá, aunque no este físicamente, tú legado de amor, perseverancia y sacrificio continúa inspirándome cada día. Se que desde el cielo estas celebrando conmigo y compartes mi alegría. Este título con mucho orgullo lo dedico a ti, mi angel guardián.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por haberme permitido encontrar mi vocación de servicio, ser mi guía durante mi formación académica y haber permitido culminar esta etapa de mi vida, quien me ha brindado fuerza, sabiduría y resiliencia en cada paso de este camino académico, gracias a la vida por mostrarme lo bonito que es vivir y lo justa que puede llegar hacer.

A mis Padres Luis y Elena por ser promotores de mis sueños que con esfuerzo y dedicación y los innumerables sacrificios que han hecho para que pudiera alcanzar mis metas gracias por confiar y por siempre anhelar lo mejor para mi vida, hoy pueden ver cumplido nuestro sueño, Gracias papitos por siempre creer en mí, los admiro de una forma inimaginable.

A mis hermanas, por todo el apoyo y el amor incondicional que me ayudo a cumplir una meta más y creer en mi potencial siendo mis primeras pacientes en la clínica odontológica.

Agradezco a la Facultad de Odontología de la UCSM, por su compromiso con la educación de calidad y la formación integral que me brindaron durante estos años de preparación académica.

RESUMEN

La investigación presentó como objetivo general, determinar un prototipo de vacuna multiepítopo eficaz contra *Streptococcus mutans* mediante la identificación y selección computacional de multiepítopos conservados.

Estudio experimental, longitudinal y experimental, con un diseño candidato a vacuna multiepítopo contra las proteínas glucosiltransferasas y DltX del *S. mutans*. Para este cometido se procedió a utilizar herramientas computacionales donde se obtendrán los epítopos con alta capacidad antigénica además de estudiar su toxicidad y acoplamiento a la molécula MHC-2. Seguidamente los epítopos más antigénicos serán unidos por linkers y adheridos a una molécula coadjuvante para luego ser presentados por algoritmos a moléculas inmunes para el reconocimiento por células inmunes.

Además, se realizó una extensa búsqueda bibliográfica para poder determinar los principales factores de virulencia del *Streptococcus Mutans*, de los cuales se eligió a los más virulentos y trascendentes. El glucosiltransferasa, que tiene la función de generar la adherencia de las bacterias a partir de la metabolización de la glucosa y la posterior secreción de exopolisacáridos; y la DITX que es un elemento constituyente de la pared celular.

Los resultados, mostraron que el epítopo 1 posee un valor de 0.15 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alérgico. El epítopo 2 posee un valor de 0.13 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alérgico. El epítopo 3 posee un valor de 0.13 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alérgico. El epítopo 3 posee un valor de 0.97 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y no alérgico. El epítopo 4 posee un valor de 0.09 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alérgico.

En conclusión, sí es posible diseñar una vacuna multiepítopo altamente antigénica capaz de generar una respuesta inmunológica vía reconocimiento por TLR2, TLR4 y BCR.

Palabras claves: Vacuna, epítopo, dltX.

ABSTRACT

The general objective of the research was to determine a prototype multiepitope vaccine effective against *Streptococcus mutans* through the identification and computational selection of conserved multiepitopes.

Experimental, longitudinal and experimental study with a multiepitope vaccine candidate design against *S. mutans* glycosyltransferases and DltX proteins. For this purpose, computational tools will be used to obtain the epitopes with high antigenic capacity and to study their toxicity and binding to the MHC-2 molecule. Next, the most antigenic epitopes will be linked by linkers and attached to a coadjuvant molecule and then presented by algorithms to immune molecules for recognition by immune cells.

In addition, an extensive literature search was carried out to determine the main virulence factors of *Streptococcus Mutans*, from which the most virulent and important ones were chosen. Glucoacyltransferase, which has the function of generating the adherence of the bacteria from the metabolization of glucose and the subsequent secretion of exopolysaccharides; and DITX, which is a constituent element of the cell wall.

The results showed that epitope 1 has a value of 0.15 for histocompatibility complex 2, being antigenic, non-toxic and allergenic. Epitope 2 has a value of 0.13 for histocompatibility complex 2, being antigenic, non-toxic and allergenic. Epitope 3 has a value of 0.13 for histocompatibility complex 2, being antigenic, non-toxic and allergenic. Epitope 3 has a value of 0.97 for histocompatibility complex 2, being antigenic, non-toxic and non-allergenic. Epitope 4 has a value of 0.09 for histocompatibility complex 2, being antigenic, non-toxic and allergenic.

In conclusion, it is possible to design a highly antigenic multiepitope vaccine capable of generating an immune response via recognition by TLR2, TLR4 and BCR.

Keywords: Vaccine, epitope, dltX.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION1

CAPÍTULO I2

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION3

1.1. Determinación del problema 3

1.2. Enunciado del problema 3

1.3. Descripción del Problema 3

1.4. Justificación.....6

2. OBJETIVOS.....6

2.1 Objetivo general.....6

2.2 Objetivo Especifico.....7

3. MARCO TEÓRICO.....7

3.1. Conceptos Básicos7

3.2. Análisis de antecedentes Investigativos15

4. HIPÓTESIS20

4.1 Hipótesis Nula 20

4.2 Hipótesis Alternativa20

CAPÍTULO II21

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN 22

1.1 Técnica..... 22

1.2 Instrumentos..... 24

1.3 Material de verificación 25

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN 25

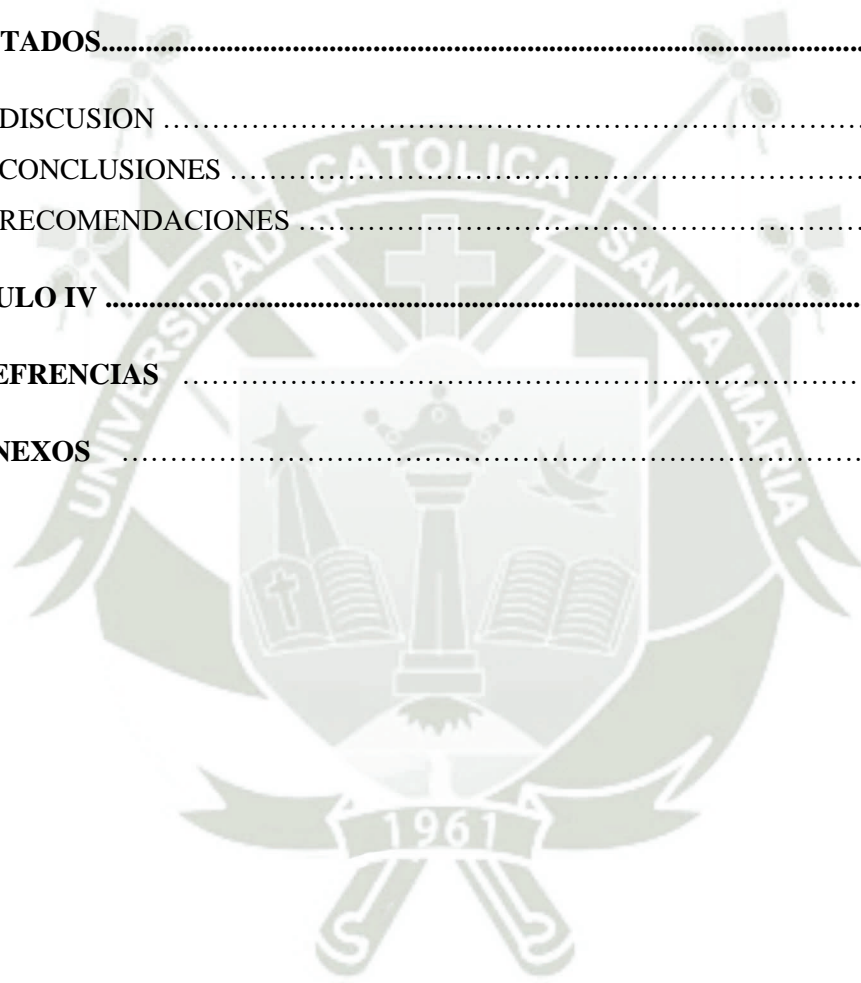
2.1. Ubicación espacial 25

2.2. Ubicación temporal..... 25

2.3. Unidad de estudio 25

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS..... 25

3.1. Organización	25
3.2. Recursos.....	25
4. ESTRATEGIA PARA EL MANEJO DE RESULTADOS	26
4.1. Plan de procesamiento.....	26
4.2. Plan de análisis de datos.....	26
CAPÍTULO III: RESULTADOS	27
RESULTADOS.....	27
1.1 DISCUSION	44
1.2 CONCLUSIONES	47
1.3 RECOMENDACIONES	48
CAPITULO IV	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	53



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1

Predicción de epítomos para MHC-2y su respectiva antigenicidad, toxicidad y
alergenicidad **28**

Tabla N°2

Secuencia FASTA de las proteínas elegidas y ubicación de los epítomos estudiados
.....**29**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Estructura 3D del epítipo KFLQLTLFYSVIFLI	30
Figura N°2: Estructura 3D del epítipo IFLILLYFFSYLGQG.....	31
Figura N°3: Estructura 3D del epítipo DGKYYYIGSDGQPK.....	32
Figura N°4: Estructura 3D del epítipo ASDNQDVRVAASNKA.....	33
Figura N°5: Estructura 3D del epítipo KVHYYHADSGELQVN	34
Figura N°6: Doking del epítipo KFLQLTLFYSVIFLI con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2	35
Figura N°7: Doking del epítipo IFLILLYFFSYLGQG con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2	36
Figura N°8: Doking del epítipo DGKYYYIGSDGQPKK con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2	37
Figura N°9: Doking del epítipo ASDNQDVRVAASNKA con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2.	38
Figura N° 10: Doking del epítipo KVHYYHADSGELQVN con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2.	39
Figura N° 11: Diseño 3D de la vacuna multiepítipo	40
Figura N° 12: Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el TLR2	41
Figura N° 13: Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el TLR4.....	42
Figura N° 14: Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el BCR	43

INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad de origen multibacteriana que compromete a la estructura dura del diente. Aunque de etiología multibacteriana, el principal microorganismo aislado de estas caries es el *Streptococcus mutans*. Este microorganismo, GRAM positivo y aeróbico, posee diversas características que lo habilitan para poder destruir el tejido dentario.

Muchos métodos y técnicas han sido desarrollados para evitar que este microorganismo pueda proliferar y causar caries. Estos métodos constan desde la higiene bucal utilizando cepillos dentales y dentífricos con características antimicrobianas, hasta el uso de medicamentos. Sin embargo, la caries dental es la primera enfermedad oral del mundo con un casi 90% de epidemiología.

El *S. mutans* posee mecanismos que permiten la producción de ácidos y su sobrevida en esos ambientes. Sin embargo, uno de sus principales factores de virulencia es la capacidad de adhesión a las superficies de los dientes. Esta característica es conferida por un conjunto de proteínas llamadas glucosiltransferasas, las cuales tiene la propiedad de generar exopolisacáridos los cuales son secretados al exterior formando así la biopelícula. Otra proteína importante es la proteína DltX la cual es la encargada de conformar la pared celular del *S. mutans* en el momento de su división y proliferación.

Con el avance de la tecnología y la llegada de la pandemia, muchos algoritmos han sido creados y mejorados para el diseño de vacunas usando herramientas computacionales, es por eso que el objetivo de este proyecto es diseñar una vacuna multiepítipo contra las proteínas glucosiltransferasas y la proteína DltX del *S. mutans*.



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO TEORICO

1.- PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 Determinación del problema

El presente trabajo de investigación se realiza con la finalidad de diseñar una vacuna multiepítopo contral el *S. mutans*.

Los factores de virulencia del *S. mutans* son varios, sin embargo, dos factores de virulencia están presentes cuando el *S. mutans* produce caries y estas son las glucosiltransferasas y la proteína DltX. El análisis in silico para determinar epítomos antigénicos para estas dos proteínas, serán realizados y métodos predictivos serán utilizados para determinar una respuesta inmune tipo 2 (adaptativa) para la generación de anticuerpos específicos contra el *S. mutans*.

1.2 Enunciado

“Diseño de una vacuna multiepítopo contra el *S. mutans* utilizando herramientas computacionales, Arequipa 2024.”

1.3 Descripción del problema

a. Área del conocimiento

- a) **Área General:** Ciencias de la Salud
- b) **Área Específica:** Odontología
- c) **Especialidad:** Cariología
- d) **Línea o tópico:** Inmunología

b. Análisis y operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADORES	SUBINDICADORES
Independiente: Diseño de Vacuna Multiepitopos	Complejo de histocompatibilidad (MHC I – MHC II)	
Dependiente: Streptococcus mutans : Glucosiltransferas y la proteína DltX	1. Antigenicidad 2. Toxicidad 3. Unión covalente	Antígeno o no antígeno. Tóxico o no tóxico KDa fuerza

c. Preguntas de investigación

a) General

- ¿Es posible diseñar una vacuna multiepitopo contra el *S. mutans*?

b) Especifica

- ¿Es posible determinar epítomos antigénicos de la enzima glucosiltransferasa del *S. mutans* para la molécula de histocompatibilidad?

- ¿Es posible determinar epítomos antigénicos para la proteína DltX del *S. mutans* para la molécula de histocompatibilidad?

d. Taxonomía de la investigación

TIPO DE ESTUDIO						
1.- Abordaje	2.- Técnica de recolección	3.- Tipo de dato que planifica recoger	4.-Número de mediciones de la variable	5.-Numero de muestras o población	6.-Ámbito de recolección	7.-Nivel
Cualitativo	Experimental	Predictivo	Longitudinal	Descriptivo	Laboratorial – in silico	Experimental

e. Tipo de investigación

Por el ámbito de recolección

En la presente investigación la técnica fue experimental, y el ámbito de recolección fue en el Laboratorio de Química de Proteínas en el Núcleo de Inmunoinformática VRI, siendo que esto conlleva a la creación intencionada de las condiciones de investigación con mayor rigor y control de la situación.

Nivel de investigación.

Investigación Explicativa o de comprobación de hipótesis. Su objetivo es la explicación de los fenómenos y el estudio de sus relaciones para conocer su estructura y los aspectos que intervienen en la dinámica de las variables.

1.4 Justificación

Relevancia Científica

Dado que la caries posee un alto porcentaje de padecimiento en la población mundial es necesario desarrollar tratamientos biológicos como vacunas contra el *S. mutans* para poder evitar así esta enfermedad.

Originalidad

El presente trabajo tiene una novedad específica, ya que hasta el momento no se ha realizado una investigación en nuestra institución donde se proponga una vacuna multiepítipo contra el *S. mutans*.

Relevancia contemporánea

Dado que existe la tecnología adecuada para desarrollar candidatos a vacunas por medio de herramientas computacionales, es adecuado proponer una vacuna multiepítipo contra el principal agente causal de la caries.

Viabilidad

Se utilizarán los laboratorios del VRI-UCSM para poder realizar dicha investigación.

Interés personal

Es de mi interés personal de obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista, y así mismo aportar conocimientos relevantes en beneficio de la Odontología

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Determinar un prototipo de vacuna multiepítipo eficaz contra *Streptococcus mutans* mediante la identificación y selección computacional de multiepítipos conservados.

2.2 . ESPECIFICOS

- Buscar epítomos específicos para MHC2 para las glucosiltransferasas.
- Buscar epítomos específicos para y MHC2 para la proteína DltX.

3. MARCO TEORICO

3.1 CONCEPTOS BASICOS

3.1.1 ¿Qué es la Vacuna?

La inmunización es un proceso donde una persona o animal asimila diversos compuestos biológicos que están diseñados y estructurados directamente para proteger la salud del individuo y prevenir cualquier tipo de enfermedad de acuerdo con la vacunación. Indudablemente, la vacunación se realiza a través de la administración de vacunas. Estas vacunas son creadas de manera artificial por expertos que se originan de componentes orgánicos y químicos para contribuir a la creación de anticuerpos en el individuo, garantizando así la protección del cuerpo contra cualquier tipo de bacteria o virus. Además, se define como la prevención que proporciona inmunidad a una enfermedad determinada, con la finalidad de evitar el contagio de microorganismos y neutralizar toxinas.

El proceso de vacunación ha salvado la vida de miles de individuos a lo largo del tiempo, evitando fallecimientos y enfermedades. Las vacunas son vistas como sustancias biológicas empleadas para una adecuada prevención de enfermedades. Cuando se administra una vacuna, el componente antígeno informa al sistema inmunológico que necesita generar anticuerpos, o sea, defensas específicas para una enfermedad específica.

3.1.2 *Streptococcus mutans*

Es un coco Gram positivo dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativa, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a 4.2 en aproximadamente 24 horas. Fue aislado e identificado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino (1). Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir

amoniacado. Esta bacteria es anaerobia facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si este no está presente también puede sobrevivir; sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis (1).

Usualmente no producen hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. En estos cultivos, las colonias son fácilmente diferenciadas: altas, convexas, pulvinadas, mucoides, de 0.5 a 1 mm de diámetro, y opacas con un aspecto que recuerda al vidrio esmerilado. Tiene la habilidad de sobrevivir, crecer y mantenerse en condiciones ácidas, aunque es especialmente ácido génico, y no es tan acidúrico como *S. sobrinus*. Esto es debido a una proteína llamada F-ATPasa unida a la membrana que transloca los protones fuera de la célula, evitando la disminución del pH intracelular (2). Esta característica hace que *S. mutans* sea bastante cariogénico y es por esta razón que los tratamientos específicos sean requeridos. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, antígenos I/II (Ag I/II), que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, que se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo (2).

Se ha sub-clasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: Los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k (3). El hospedador principal es el humano, en el que al igual que en diversos animales gnotobióticos ha mostrado su poder cariogénico. Coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento) (4). *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas interproximales y en cemento radicular, siendo más que posible su papel en la progresión del proceso (4). Esta especie sigue siendo sensible a una amplia gama de antibióticos (i.e. betalactámicos, macrólidos y lincosamidas). En los últimos años, se ha observado una lenta y progresiva pérdida de sensibilidad, y se han descrito cepas con elevados grados de resistencia a los aminoglucósidos, y tolerantes a la penicilina (3). Aunque no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes y de monos Rhesus (2).

Es el principal agente etiológico de la caries dental. Aunque otro factor de riesgo para el desarrollo de caries dental es la infección por *Streptococcus sobrinus* (5). De hecho, una co-infección de *S. sobrinus* y *S. mutans* causa un incremento en la incidencia de la enfermedad. En Colombia según el III Estudio Nacional de Salud Bucal, el 95% de la población mayor de 20 años tiene historia de caries, lo que convierte esta patología en un problema de salud pública (6). Para profundizar en el conocimiento del microorganismo y aportar a la solución, es necesario contar con medios de cultivo que garanticen el crecimiento y la recuperación del patógeno causal (7).

3.1.3 Factores de virulencia

En general, algunos estreptococos viridans que habitan en la cavidad bucal han surgido como patógenos importantes asociados predominantemente con la iniciación y la patogenia de las caries dentales. *S. mutans*, principalmente, junto con *S. sobrinus* y otros miembros del “grupo mutans” de estreptococos bucales son capaces de producir enzimas denominadas glucosiltransferasas (GTF) y Fructosiltransferasas (FTF), que hidrolizan la sacarosa de la dieta y conectan las porciones de glucosa entre sí en uniones $\alpha 1,6$ y $\alpha 1,4$ glucosídicas para formar glucanos insolubles (8). Estos glucanos permiten a los microorganismos adherirse a las superficies lisas de los dientes y forman la matriz de la placa dental, el denominado biofilm. La fijación específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos adherentes e insolubles y la formación ulterior de ácidos conduce a la desmineralización del esmalte dental y a la iniciación de lesiones de caries. El medio más común para el aislamiento de *S. mutans* es el Agar Mitis Salivarius con un suplemento de bacitracina y sacarosa al 20%, el cual hace la selección de otros estreptococos (9).

3.1.4 El biofilm como mecanismo de adherencia:

El Biofilm se describe como una comunidad compleja de microorganismos, cerca de 700 especies bacterianas, adheridos a una superficie; estos microorganismos se encuentran embebidos en una matriz extracelular que deriva de ellas mismas (10). Forman dos tipos de biofilm en la superficie del diente: La placa supragingival y la placa subgingival, que difieren significativamente en la composición de la flora bacteriana. La placa

supragingival es dominada por bacterias Gram positivas, incluyendo a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. mitis* y *Lactobacillus*, mientras que la placa subgingival es dominada por bacterias anaeróbicas Gram negativas, tales como *Actinobacillus*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* (11). La causa de la caries dental generalmente es causada por el microbioma de la placa supragingival. El microbioma subgingival está asociado con la gingivitis y la enfermedad periodontal (9).

Para que se dé la formación y desarrollo del biofilm existen tres etapas principales (12):

- 1) La fijación de las especies pioneras iniciales, lo que conduce a un aumento en la masa del biofilm debido a la colonización, co-adhesión, co-agregación de otras especies de microorganismos;
- 2) La producción de polisacáridos extracelulares y;
- 3) La separación de las bacterias de la superficie del biofilm y su propagación en el medio ambiente de la cavidad oral.

La acumulación de microorganismos en el biofilm es muy rápida, como resultado de la agregación entre especies de estreptococos con actinomicetos, así como la aglutinación de microorganismos dentro de una especie, que conduce a la agregación de nuevas especies bacterianas con los ya establecidos (12). Entre los primeros colonizadores del biofilm se encuentran, diferentes especies de *Streptococcus spp.*, principalmente *S. mutans*, *Eikenella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Priopionibacterium spp.*, y *Veillonella spp.*, han sido identificados en un 60-90% de los casos. Los colonizadores tardíos incluyen a *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Treponema spp.* y *Porphyromonas spp* (13).

Un papel importante en la formación del Biofilm es atribuido a los polisacáridos extracelulares (EPS) que contiene, entre otros, manosa y residuos glicosídicos, que forman una capsula bacteriana o se liberan en el medio ambiente, donde se convierten en parte del moco (12). La composición del EPS varía dependiendo de la cepa bacteriana y las condiciones ambientales. Los polisacáridos extracelulares son creados también por otras bacterias en la cavidad oral, tales como *S. sanguis* y *A. viscosus*, pero un papel

importante en su producción se atribuye a *S. mutans*. Una de las funciones importantes del EPS, es la protección de estos microorganismos contra el sistema de defensa del huésped y esto es significativo para la naturaleza patógena de los microorganismos cariogénicos (12).

Otra propiedad importante del biofilm bacteriano, es la capacidad de comunicarse entre sí y regular los procesos metabólicos. El Quorum sensing (QS) representa una vía de señalización que se activa como respuesta a la densidad celular. Los estímulos del sistema del QS son moléculas de señal llamadas auto-inductores, y su concentración es una función de la densidad microbiana. Las bacterias son capaces de identificar con precisión la naturaleza química de las señales y su umbral de concentración en el ambiente, lo que permite su crecimiento y control específico de procesos fisiológicos y metabólicos de toda la población. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas han desarrollado diferentes sistemas de transmisión del QS para las moléculas de señalización. La función de auto-inductores en bacterias Gram-negativas se cumple por la Acil-homoserin lactona (AHLs), y en Gram-positivos por oligopéptidos específicos y auto-inductores 2 (AI-2) (14).

La formación del biofilm dental puede conducir a el desarrollo de enfermedades infecciosas orales, tales como a caries, gingivitis e inflamación periodontal. *S. mutans* pertenecen al grupo de colonizadores de dientes humanos y tiene la habilidad para metabolizar varios carbohidratos en ácidos orgánicos, los cuales pueden conducir a la destrucción cariogénica de la superficie dental (15).

Finalmente, la capacidad metabólica de este microorganismo para sintetizar glucanos a partir de la sacarosa, además de su capacidad de producir ácido y bacteriocinas, tiene gran importancia en el proceso de iniciación y desarrollo de la caries dental (9).

3.1.5 Asociación entre Caries dental y *Streptococcus mutans*

S. mutans ha ocupado el interés de muchos investigadores desde épocas remotas; en 1890, W. Miller, microbiólogo británico, propuso la teoría quimioparasitaria para explicar el fenómeno de la caries dental, relacionando microorganismos, carbohidratos de la dieta y enfermedad dental; en 1924, Kilian Clarke, otro microbiólogo británico, asiló la bacteria *S. mutans* de lesiones cariosas. Más tarde, en la mitad del siglo XX, los esfuerzos

investigativos del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos y de los países escandinavos confirmaron las propiedades cariogénicas de este microorganismo, demostrando su transmisibilidad y distribución mundial. Aunque la presencia de esta bacteria es una causa determinante, no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad (16).

S. mutans se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere de tejido duro no descamativo para su colonización (1). La principal fuente de adquisición y transmisión de este microorganismo en los niños es la saliva de sus madres. Se ha demostrado que el tiempo exacto de colonización de esta bacteria es a los 26 meses de edad, período que ha sido denominado “ventana de infectividad” 25486222. Por lo anterior, es importante recordar que *S. mutans* forma parte de la flora oral microbiana, por lo que se puede encontrar tanto en pacientes con y sin caries (17).

Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado relación del *S. mutans* con caries dental en humanos entre un 74% y 100% en diversas poblaciones, lo que ha conducido a proponer a este microorganismo como el más importante en la iniciación de caries. En estudios previos realizados por Köhler y cols. (1984; 1995), demostraron que el éxito en la reducción de *S. mutans* en madres altamente colonizadas por *S. mutans* durante la aparición de los dientes primarios en sus hijos pudo prevenir o retrasar la colonización de los niños por esta bacteria durante un período de tiempo prolongado. Por otra parte, también demostraron que el retraso en la colonización por *S. mutans* estaba aún asociado con una menor prevalencia de caries en los niños a los 7 años de edad en comparación con los niños que habían sido colonizados tempranamente (18, 19).

Las asociaciones entre la experiencia de caries en la dentición temporal y permanente con *S. mutans* se han demostrado en varios estudios. Sin embargo, pese a existir evidencia que sustenta la asociación de *S. mutans* con caries inicial y avanzada, se ha observado que esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de esta bacteria, y que individuos con altos recuentos de ella no necesariamente desarrollan lesiones cariosas. Debido a su relación con la caries dental, la evaluación de la concentración de *S. mutans* en placa y saliva puede ayudar al diagnóstico de las actividades de caries, especialmente en la población más vulnerable que es la infantil (6).

3.1.6 El complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

MHC (Mayor Histocompatibility Complex) es el nombre que se le da a una región genética con un alto polimorfismo en la que se encuentran codificadas, entre otras cosas, proteínas involucradas en el procesamiento y la presentación de antígenos. En los humanos se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y sus genes reciben también el nombre de Antígenos Leucocitarios Humanos o HLA (por las siglas en inglés) (20).

Este complejo está organizado en tres regiones: MHC de clase I (MHC-I), MHC de clase II (MHC-II) y MHC de clase III (MHC-III). De estas, el MHC-III tiene la mayor densidad de genes de todo el genoma humano y codifica para algunos mediadores de la inmunidad humoral como factores del sistema del complemento, factores de necrosis tumoral (TNF), entre otros, [3] pero para los fines de esta tesis, a partir de este momento sólo se hablará del MHC-I y el MHC-II, puesto que son los que están directamente involucrados en el procesamiento y la presentación antigénica (21).

I) MHC-I

En su secuencia nucleotídica se encuentran codificadas las moléculas clásicas HLA-A, HLA-B y HLA-C, que se expresan constitutivamente en la superficie externa de la membrana citoplasmática de todas las células nucleadas (22).

Estas moléculas son de naturaleza proteínica y tienen una estructura formada por una cadena α asociada a una β 2-microglobulina; a su vez, la cadena α tiene tres dominios extracelulares de inmunoglobulina (α 1, α 2 y α 3), un dominio transmembranal hidrofóbico y una región citoplasmática en el extremo carboxilo terminal, mientras que la β 2-microglobulina sólo cuenta con un dominio de inmunoglobulina extracelular (23).

Sus funciones están relacionadas con el reconocimiento de péptidos, para lo cual, entre los dominios α 1 y α 2 se encuentra una hendidura que permite la unión de péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos, aunque se sabe que en ocasiones estos pueden llegar a ser más grandes. Esta hendidura está formada por una plataforma de 8 hojas β plegadas antiparalelas y 2 hélices α que en conjunto tienen una estructura tridimensional similar a una hamaca (24).

Los péptidos presentados por estas moléculas son presentados a linfocitos T CD8+ y en la mayoría de las ocasiones son de origen citosólico, es decir que, provienen de proteínas situadas en el interior de la célula (24).

II) MHC-II

La región del MHC-II también contiene la información para sintetizar tres tipos de moléculas clásicas (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) que comparten características estructurales con las moléculas de MHC-I, no obstante, no son del todo iguales (21).

Estas moléculas son expresadas de manera constitutiva sólo en la superficie externa de la membrana citoplasmática de las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B (células presentadoras de antígenos profesionales o APC), aunque se sabe que, en condiciones inflamatorias, otras estirpes celulares también pueden llegar a expresarlas de manera inducible (25).

A diferencia de las moléculas del MHC-I, las del MHC-II están constituidas por una cadena α y una β (son heterodiméricas); cada una de ellas tiene dos dominios extracelulares de inmunoglobulina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$), un dominio transmembranal hidrofóbico y una región citoplasmática en el extremo carboxilo terminal (26).

Su sitio de unión al péptido se localiza entre los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ y tal como con las moléculas de clase I, este está formado por una plataforma de 8 hojas β plegadas antiparalelas y 2 hélices α , aunque en este caso, se asocia a fragmentos peptídicos de 12 a más de 20 aminoácidos provenientes de proteínas degradadas por la vía endocítica de procesamiento antigénico (26).

Finalmente, la última diferencia con las moléculas de clase I es que, las de clase II sólo presentan péptidos a los linfocitos T CD4+ (26).

3.1.6 La presentación antigénica

Para facilitar el estudio del sistema inmune se le suele dividir en innato y adaptativo. El sistema innato representa la primera línea de defensa ante un agente infeccioso o potencialmente lesivo, está constituido por barreras físicas y químicas y un conjunto de leucocitos y está presente en todos los animales, mientras que, la respuesta adaptativa es

exclusiva de los vertebrados, se caracteriza principalmente por tener especificidad de reconocimiento, generar memoria inmunológica y tener como efectores celulares a los linfocitos B y T (24).

Los linfocitos T tienen como función el ayudar a eliminar patógenos, células infectadas y/o cualquier otro estímulo que altere la homeostasis de los tejidos como un trasplante o un proceso neoplásico. Además, cooperan con los linfocitos B para que se puedan producir anticuerpos que provean de protección contra patógenos extracelulares o toxinas. No obstante, los linfocitos T maduros no son capaces de llevar a cabo estas funciones de manera independiente; primero necesitan que una APC les presente un antígeno asociado a una molécula del MHC, sólo entonces se podrán activar para adquirir un perfil efector (26).

3.2 ANÁLISIS DE LOS ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

3.2.1 Internacionales

- **TÍTULO:** Dental caries vaccine: are we there yet?

- **AUTOR:** M. Patel

- **FUENTE:**

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518435/>

PMID: 31518435 DOI: 10.1111/lam.13218

- **RESUMEN:**

La caries dental, causada por *Streptococcus mutans*, es una infección común. La vacuna contra la caries ha estado bajo investigación durante los últimos 40 años. Muchos estudios in vitro e in vivo y algunos ensayos clínicos en humanos han determinado muchos aspectos pertinentes respecto del desarrollo de vacunas. Los determinantes de virulencia de *Strep.* Se sabe que *mutans*, como Ag I/II, responsable de la adherencia a las superficies, glucosiltransferasa, responsable de la producción de glucano, y la proteína de unión a glucano, responsable de la unión del glucano a las superficies, provocan una respuesta inmune específica del antígeno. respuesta. También se sabe que más de un

antígeno o una parte funcional del genoma responsable de estos determinantes de virulencia proporciona una mejor respuesta del huésped en comparación con la vacuna monogénica o el genoma completo de un antígeno específico. Para mejorar la respuesta del huésped, se ha estudiado el uso de adyuvantes y se han investigado las vías de administración del antígeno. En los últimos años, se han desarrollado y probado en animales algunas vacunas prometedoras como pGJA-P/VAX, derivado de LT/Pi39-512, KFD2-rPAc y SBR/GBR-CMV-nirB. Es necesario explorar nuevos objetivos de virulencia. Se requieren estudios colaborativos multicéntricos y ensayos clínicos en humanos y se debe generar cierto interés por parte de los financiadores y expertos en salud pública para superar este obstáculo.

- **TITULO:** *Streptococcus mutans* glutamate binding protein (GlnH) as antigen target for a mucosal anti-caries vaccine

- **AUTOR:** Souza Pereira G, Batista MT, Dos Santos NFB, Passos HM, da Silva DA, Ferreira EL, de Souza Ferreira LC, de Cássia Café Ferreira R.

- **FUENTES:**

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36098933/>

PMID: 36098933

DOI: 10.1007/s42770-022-00823-0

- **RESUMEN:**

En este estudio, generamos una forma recombinante de la proteína GlnH de *S. mutans* (rGlnH) en *Bacillus subtilis*. Los ratones inmunizados con este antígeno proteico provocaron fuertes respuestas de anticuerpos específicos del antígeno después de la administración sublingual de una formulación de vacuna que contiene un adyuvante mucoso, un derivado no tóxico de la toxina termolábil (LTK63) producida originalmente por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (ETEC). Los anticuerpos séricos anti-rGlnH redujeron la adhesión de *S. mutans* a la cavidad bucal de ratones sin tratamiento previo. Además, los ratones inmunizados activamente con rGlnH quedaron parcialmente protegidos de la colonización oral después de la exposición a la cepa NG8 de *S. mutans*.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que *S. mutans* rGlnH es un antígeno diana potencial capaz de inducir respuestas de anticuerpos específicas y protectoras después de la inmunización. En general, estas observaciones plantean la perspectiva del desarrollo de vacunas anticaries de las mucosas.

- **TITULO : Insight into status of dental caries vaccination: A review**

- **AUTOR :** Cherukuri G, Veeramachaneni C, Rao GV, Pacha VB, Balla SB

- **FUENTES :**

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34083906/>

PMID: 34083906

DOI: 10.4103/JCD.JCD_402_20

- **RESUMEN :**

A pesar de los avances del siglo XXI, la caries dental sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más comunes. Su prevalencia fue confirmada por la Organización Mundial de la Salud y afirma a la caries dental como un importante problema de salud en todo el mundo. Aunque el proceso de caries dental es multifactorial, las bacterias orales, los estreptococos mutans, como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, se consideran agentes causantes de la caries dental en humanos. Se realizaron numerosos estudios en animales y se desarrollaron diversas categorías de vacunas, como la vacuna de células enteras, la vacuna de subunidades y los péptidos sintéticos. Independientemente del éxito de la inmunización activa y pasiva basada en ensayos con animales, es el fenómeno de la reactividad del corazón humano el que limitó la aplicabilidad de estos ensayos en humanos. Se están realizando esfuerzos continuos para superar estas limitaciones y lograr mayores éxitos en los ensayos en humanos. Con la aparición de diversos anticuerpos contra antígenos de estreptococos mutans, la inmunización pasiva local se ha convertido en el método más seguro en humanos contra la colonización de bacterias y la inducción de caries. Esta revisión proporcionó información sobre la epidemiología, la inmunización activa y pasiva en ensayos tanto en animales como en humanos, así como las perspectivas de la vacunación contra la caries.

- **TÍTULO:** DESARROLLO DE UNA VACUNA MULTI-EPÍTOPO, MULTI-ANTÍGENO Y MULTIESTADO CONTRA LA INFECCIÓN DE *Helicobacter pylori*

- **AUTOR:** Beatriz Meza Marquez

- **FUENTES:**

URL: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3049>

DOI: 10.410/23

- **RESUMEN:**

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una vacuna utilizando varios epítomos de antígenos inmunogénicos de *H. pylori*, involucrados en diferentes etapas del proceso de patogénesis. Mediante herramientas bioinformáticas se diseñó “CTB-multiHp”; una vacuna multi-epítomo, multi-antígeno y mutiestado, compuesta por la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) fusionada con epítomos de 7 antígenos principales (Ureasa B, CagA, NapA, VacA, HpaA, HspA, GGT) de *H. pylori*.

Las propiedades inmunológicas de la vacuna CTB-multiHp fueron caracterizadas. La proteína quimérica exhibió inmunorreactividad con sueros de pacientes con diferentes grados de infección por *H. pylori*. Además, se inmunizaron ratones con CTB-multiHp; lo cual probó su inmunogenicidad y la inducción de anticuerpos neutralizantes que revelaron efectos inhibitorios en la actividad de Ureasa

Conclusion : Los resultados experimentales indicaron que la inmunización con CTB-multiHp ocasionó una reducción significativa de la colonización de *H. pylori* en el estómago de los gerbos de Mongolia. La protección de CTB-multiHp se asoció con la ausencia de patología gástrica característica, la producción de anticuerpos IgA, IgG e IgM, y la posible inducción de una respuesta mixta de células Th1-Th2. Estos resultados demuestran que la vacuna CTB-multiHp basada en epítomos de células T y B de varios antígenos de *H. pylori* podría ser un candidato prometedor contra la infección por *H. pylori*.

3.2.2 Nacionales

- **TITULO:** Análisis bibliométrico del panorama actual de la producción científica mundial sobre el desarrollo de vacunas contra la caries dental (2011-2020)
- **AUTOR:** Torres Loyola, Alejandra Mercedes, Rojas Arana, Carlos Adrián
- **FUENTES:**
URL: <https://hdl.handle.net/20.500.12805/3077>
DOI: <https://doi.org/10.21142/tl.2023.3077>
- **RESUMEN:**

El objetivo del presente estudio fue realizar un análisis bibliométrico de la investigación científica sobre el desarrollo de vacunas contra la caries dental. Métodos: Se realizó una extracción de la producción científica publicada sobre el desarrollo de vacunas contra la caries dental entre los años 2011 y 2020 de la base de datos Scopus . Se utilizó Microsoft Excel para la elaboración de tablas y Scival para el análisis de datos, los cuales se dividieron en indicadores de producción, impacto y colaboración. Se utilizó VOSviewer para el análisis de co-ocurrencia de las palabras clave y redes colaborativas. Resultados: Se recuperaron 106 estudios de la base de datos Scopus, que se realizaron sobre el desarrollo de vacunas contra la caries dental dentro de los años 2011-2020. La universidad de Wuhan, en China, fue la universidad con mayor producción científica sobre el tema, con 4 publicaciones, siendo el país donde se encuentra, el más productivo. Sobre las revistas más productivas, el primer lugar fue ocupado por Journal of Dental Research con 7 publicaciones. El mayor porcentaje de los documentos analizados se ubicaron en revistas de cuartil 1 y en el patrón de colaboración nacional.

Conclusión: La mayoría de los manuscritos realizados respecto al desarrollo de vacunas contra la caries dental fueron publicados en China y en revistas del cuartil Q1. Además, se encontró que Yan Huimin, Yang Jingyi, Zhou Dihan, Yang Yi, Li Yuhong y Fan Mingwen encabezan la lista de autores más productivos. Asimismo, se identificó a Journal of Dental Research como la revista más productiva y citada.

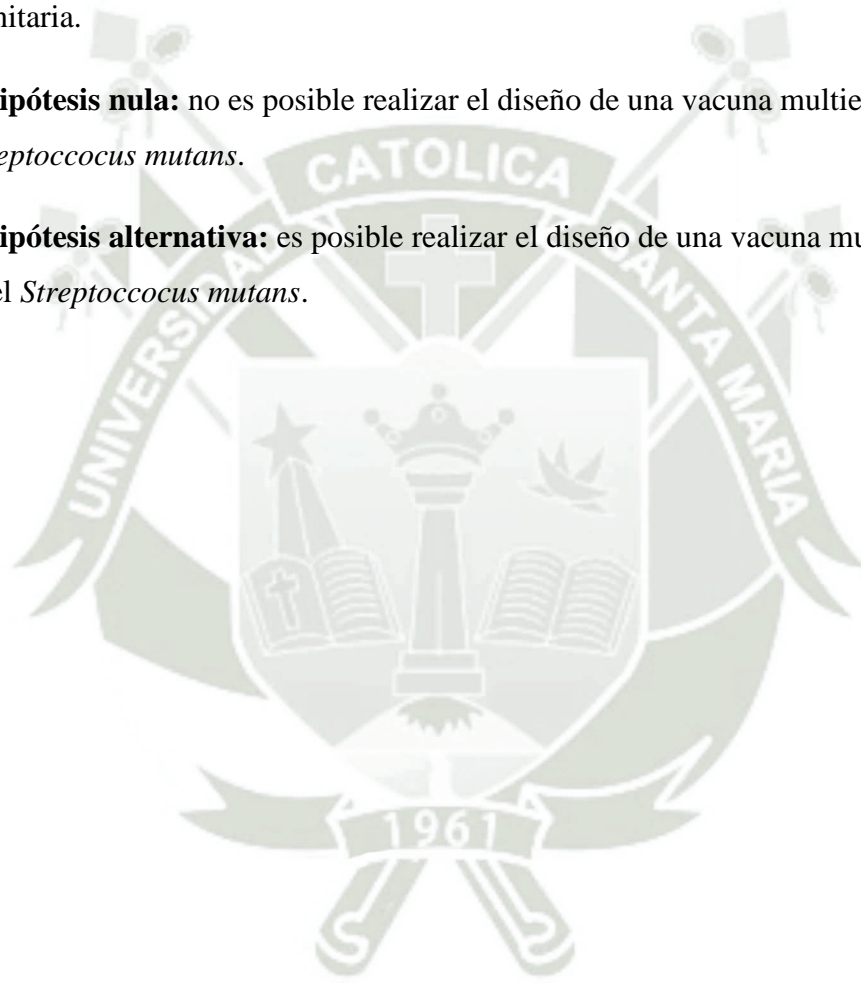
4. HIPOTESIS

Dado que existen herramientas computacionales para el diseño in silico de candidatos a vacunas para los microorganismos emergentes.

Es probable la identificación y selección de epítomos conservados en *Streptococcus mutans* que permitirá el prototipo de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

4.1 Hipótesis nula: no es posible realizar el diseño de una vacuna multiepítomo para el *Streptococcus mutans*.

4.2 Hipótesis alternativa: es posible realizar el diseño de una vacuna multiepítomo para el *Streptococcus mutans*.





CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

II. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TECNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

1.1 Técnica:

- **Especificación de la Técnica**

La técnica que se empleara consiste en una vacuna multiepítopo contra las proteínas glucosiltransferasas y DltX del *S. mutans*. Para este cometido se procederá a utilizar herramientas computacionales donde se obtendrán los epítomos con alta capacidad antigénica además de estudiar su toxicidad y acoplamiento a la molécula MHC-2. Seguidamente 6 epítomos más antigénicos serán unidos por linkers y adheridos a una molécula covalente para luego ser presentados por algoritmos a moléculas inmunes para el reconocimiento por células.

Variable de investigación	Indicadores	Técnica	Instrumento
Diseño de Vacuna Multiepítomos	Complejo de histocompatibilidad (MHC I – MHC II)	Herramientas bioinformáticas	Software Pymol. Softwares libres de predicción
Proteínas glucosiltransferasas y DltX del <i>S. mutans</i>.	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenicidad • Toxicidad • Unión Covalente 	Observación clínica en laboratorio	Ficha de tabulación

- **Descripcion de la Tecnica**

Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST)

Proteoma del *Streptococcus mutans* y sus respectivos factores de virulencia como **Glucosiltransferasas y la proteína DltX**, serán estudiadas a nivel computacional el

software DNASTAR Lasergene (Wisconsin, EE. UU.) Para proteínas similares. La alineación de la secuencia se realizó utilizando el servidor Clustal Omega con los parámetros predeterminados (27).

Predicción de epítomos de células B, linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T auxiliares (HTL)

Los epítomos de células B se predijeron utilizando el servidor BepiPred y el servidor Elliprot para examinar la posición del epítomo en una estructura 3D. Los epítomos HTL se predijeron utilizando las herramientas de predicción de unión de MHC II (<http://tools.iedb.org/mhcii>). Las propiedades antigénicas de los epítomos se estudiaron utilizando el servidor Vaxijen 2.0 a un umbral de 0,4. La toxicidad de los péptidos se predijo desde el servidor ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>), y la alergenicidad se predijo desde el servidor AllegernFP 1.0 (<http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>). Todos estos análisis se tuvieron en cuenta para seleccionar los epítomos (27).

Análisis de proteínas hidrofóbicas y antigénicas

El análisis hidrofóbico y antigénico se realizó utilizando el algoritmo Kyte-Doolittle y Jameson-Wolf de proteína viral. Para determinar si el epítomo encontrado estaba ubicado en la superficie externa de la proteína donde ocurre la formación de antígeno-anticuerpo, se realizó una superposición de los epítomos predichos y los resultados del análisis hidrófobo y antigénico. Para este método se utilizó el programa DNASTAR Protean (Wisconsin, EE. UU.) (27).

Modelado de proteínas y acoplamiento molecular

El modelado tridimensional de los epítomos seleccionados se modeló con el servidor PEPFOLD 3. El acoplamiento molecular de los péptidos se realizó utilizando el servidor CABS-dock (<http://212.87.3.12/CABSdock/>) para el alelo HLA-DR52c de MHC clase II (PBD: 3C5J). El servidor HawKRank se utilizó para obtener puntos (27).

Construcción in silico de la vacuna multiepítopo

El modelado tridimensional del multiepítopo se realizó utilizando el servidor en línea I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), mientras que el Z-score se utilizó para verificar la calidad del Modelado de proteínas 3D para seleccionar el mejor modelo. Los epítopos en cuestión fueron unidos entre sí usando el link EAAAK y el conjunto fue unido al coadyuvante beta actina (GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKEEQIGKICSTRGRKCCRRKK) (27).

Predicción del acoplamiento de la vacuna multiepítopo a receptores TLR2, TLR4 y B

Una vez diseñada la vacuna, esta será sometida a métodos predictivos de unión con receptores como TLR2 (PDB ID: 2Z7X), TLR4 (PDB ID: 4G8A) y receptor de células B (BCR) (PDB ID: 3KG5). Este paso se usará el servidor HAADOCK (27).

1.2 INSTRUMENTO

1.2.1 Instrumentos documentales

a) Estructura:

La investigación hará uso de la ficha de tabulación, la cual sirve como un marco bien organizado para evaluar con precisión los indicadores de cada una de las variables incluidas en la tabla de operacionalización.

b) Modelo de Instrumento:

La ficha de Tabulación que se incluye en el anexo N°1.

1.2.2 Instrumentos mecánicos

- Computadora.
- Impresora.
- Cámara fotográfica.

1.3 Material de verificación

- Software Pymol.
- Softwares libres de predicción.

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1 Ubicación espacial

Núcleo de Inmunoinformática de la UCSM.

2.2 Ubicación temporal

La investigación será llevada a cabo en los meses de Agosto a Noviembre .

2.3 Unidades de estudio

- Epítomos

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS

3.1 Preparación de las unidades de estudio

Al ser un experimento in silico, se usará el proteoma del *S. mutans* y epítomos escogidos.

3.2 Recursos

a. Recursos económicos

- El presente trabajo es financiando por el autor.

b. Recursos humanos

- **Investigador:** Bachiller Rosa Stefany Corrales Medina.

□ **Asesor:** Dr. Gustavo Obando Pereda.

c. Recursos físicos

□ Núcleo de Inmunoinformática.

d. Recursos Institucionales

- Laboratorio de Química de Proteínas-VRI, UCSM.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR RESULTADOS

a. Nivel de sistematización

Hojas de tabulación con los epítomos analizados.

b. Estudio de los datos

Se realizarán por medio de herramientas computacionales descritas en la metodología.



CAPITULO III: RESULTADOS

RESULTADOS :**Tabla N°1**

Predicción de epítomos para MHC-2y su respectiva antigenicidad, toxicidad y alergenicidad.

S/N	Core Peptide	Length	MHCII Alleles	Score/Percentile	Antigenicity	Toxicity	Allergenicity
1	KFLLQTLFYSVIFLI	15	HLA- DRB4*01:01	0.15	Antigen	Non-toxin	Allergen
2	IFLILLYFFSYLGQG	15	HLA- DRB4*01:01	0.13	Antigen	Non-toxin	Allergen
3	DGKYYYIGSDGQPKK	15	HLA- DRB4*01:01	0.13	Antigen	Non-toxin	Allergen
4	ASDNQDVRVAASNKA	15	HLA- DRB4*01:01	0.97	Antigen	Non-toxin	Non-allergen
5	KVHYYHADSGELQVN	15	HLA- DRB4*01:01	0.09	Antigen	Non-toxin	Non-allergen

El epítomo KFLLQTLFYSVIFLI posee un valor de 0.15 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alergeno. El epítomo IFLILLYFFSYLGQG posee un valor de 0.13 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alergeno. El epítomo DGKYYYIGSDGQPKK posee un valor de 0.13 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alergeno. El epítomo ASDNQDVRVAASNKA posee un valor de 0.97 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y no alergeno. El epítomo KVHYYHADSGELQVN posee un valor de 0.09 para el complejo de histocompatibilidad 2, siendo este antigénico, no tóxico y alergeno.

Tabla N°2

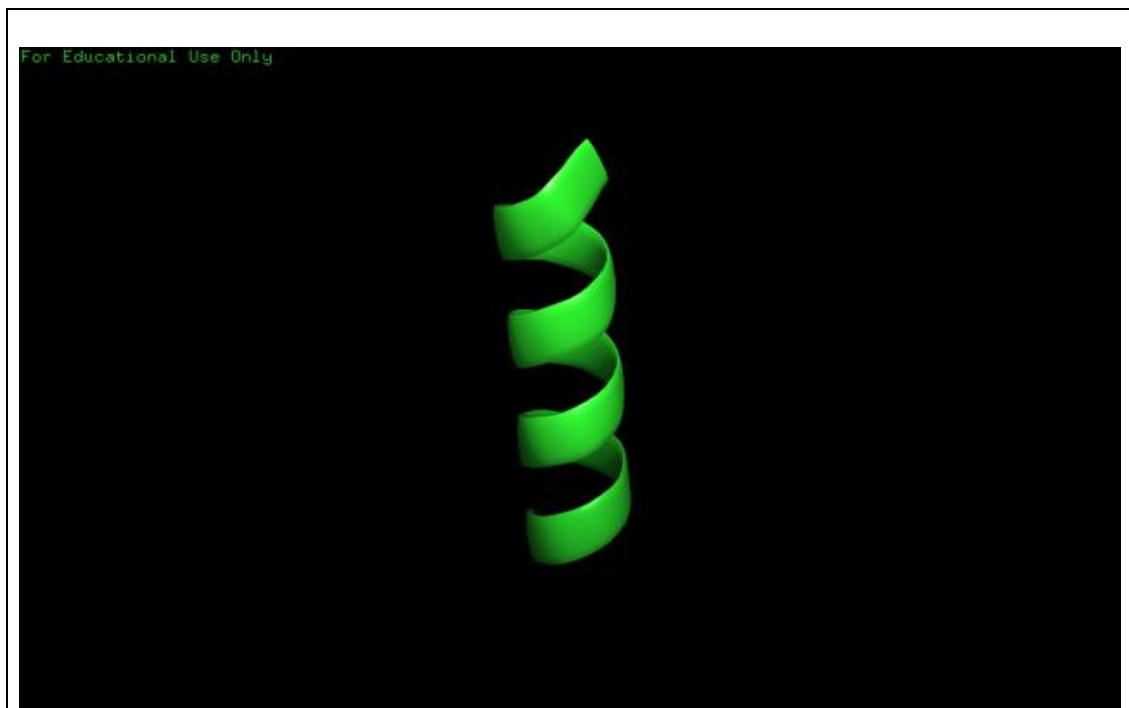
Secuencia FASTA de las proteínas elegidas y ubicación de los epítomos estudiados

<pre>>AY047198.1 teichoic acid D-Ala incorporation-associated protein DltX [Streptococcus mutans] MKKRRTIYKFL LQTLFYSVIFL ILLYFFSYLGQGQGEFIYNEF</pre>
<pre>>QGU39849.1 glucosyltransferase [Streptococcus mutans] METKRRYKMHKVKKHVVAVASGLITLGTTLGSSVSAETEQQTSDKVVTQKSEDDKAASESSQTDAPK TQAQSQANVADTSTSI TKETPSQNI TTQANSDDKTVTNTKSEEAQTSEERTKQAEAAQTASSQALTQAK TAAQENKNPVDLAAIPNVKQIDGKYYYIGSDGQPKK NFALTVNNKVLYFDKNTGALTDTSQYQFKQGLTK NQIVNFENTSLETIDNYVTADSWYRPKDILKNGKTWTASSEDLRPLLMSWVDPKQTQIAYLNYMNQQGL DSSQESLNLAQTVQVKIETKISQTQQTQWLRDIINSEVKTQPNWNSQTESDTSAGEKDHLLQGGALLYSN SDYRLLNRTPTSQTGPKPYFEDNSSGGYDFLLANDIDNSNPVVQAEQLNWLHYLMNYGSIVANDPEANFD NVNADLLQIASDYLKAHYGVDKSEKNAINHLSILEAWSDNDPQYNKDTKGAQLPIDNKLRLSLLYALTRF NEIRSGLEPVIITNSLNNRSAEGKNSERMANYIFIRAHSEVQTVIAKIIKAQINPKTDGLTFTLDELKQA RQAKKKYTQSNIPTAYALMLSNKDSITRLLYYGDMYSDGQYMATKSPYYDAIDTLLKARIKYAAGGQDMK SHMDWDYTGVLTSVRYGTGANEATDQGEATKTQGMAVITSNNPSLKLNDKVIIVNMGAHKNQEYRPL TSYTSDAAAKSLYRKTNDKGELVFDASDIQGYLNPQVSGYLAVVWPVVGASDNQDVRVAASNKA NDTGQVY QLIYEGFSNFQDFVTKDSYTNKKAQNVQLFKSWGVTSEMAPQYVSSSEDGSFLDSIQNGYAFEDRYD YGSQQDMINAVKALHKSGIQVIADWVDPQIYNLPGKEVVTATRVNDYGEYRKDSEIKNTLYAANTKSNKG AFLSELAAKYPSIFNRTQISNGKKIDPSEKITAWKAKYFNGTNI LGRGVGYVLKDNASDKYFELKGNQTY EASTGFVNDGNGMTFYSTSGYQAKNSFVQDAKGNWYFDFNNGHMVYGLQHLNGEVQYFLSNGVQLRESFL YFGHLGNRYSNGYYSFDNDSKWRYFDASGVMVGLKTINGNTQYFDQDGCQVKGAWITGSDGKKRYFDDG FANDKNGDWYLLNSDGIALVGVQTINGKTYFYGQDGKQIKGKIITDNGKLYFLANSSELARNIFATDSQ DGVAVTGSQTIAGKKLYFASDGKQVKGSFVTYNGKVHYYHADSGELQVNRFEADKGNWYLLDSNGEALT RVFFFTREGKQVKGDVAYDERGLLRYYDKNSGNMVMYKVVTLANGRRIGIDRWGIARY</pre>

Los epítomos KFL LQTLFYSVIFL I y IFL ILLYFFSYLGQG de la proteína DltX están ubicados dentro de la proteína, siendo estos visibles para los anticuerpos. Los epítomos DGKYYYIGSDGQPK, ASDNQDVRVAASNKA y KVHYYHADSGELQVN de la proteína glucosiltransferasa están ubicados dentro de la proteína, siendo estos visibles para los anticuerpos.

Figura N°1

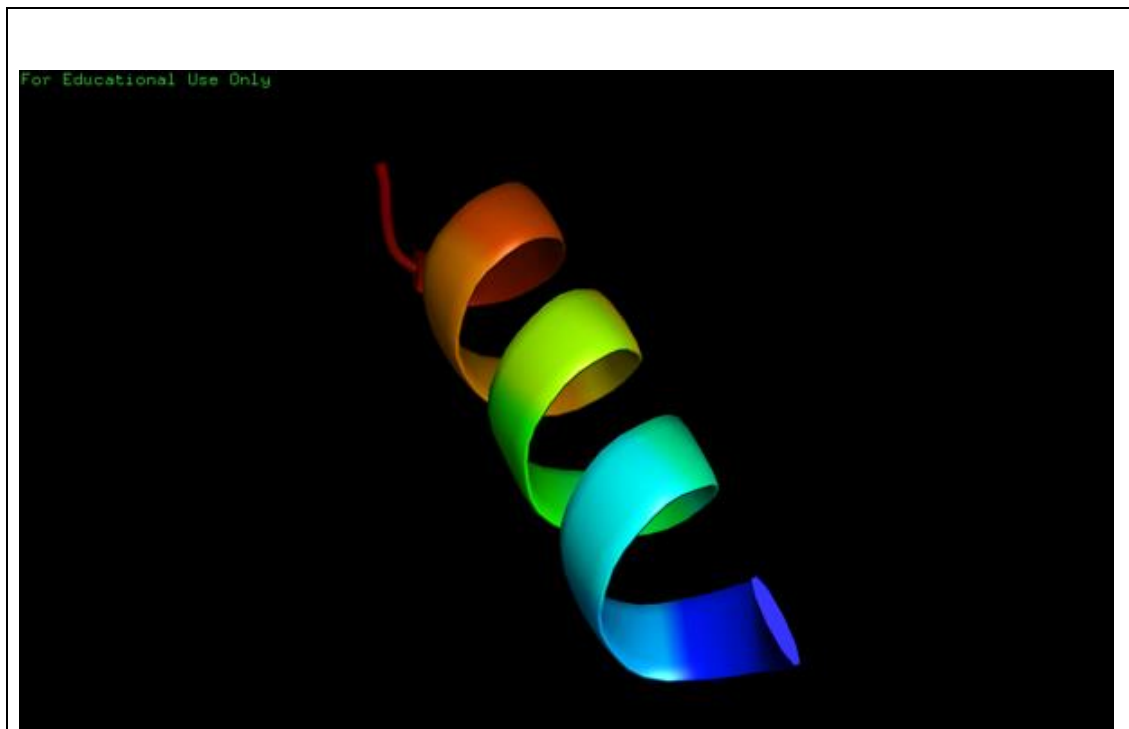
Estructura 3D del epítopo KFLQTLFYSVIFLI



Estructura 3D diseñada por el programa PEPFOLD donde se denota su estructura de cadenas Beta plegadas.

Figura N°2

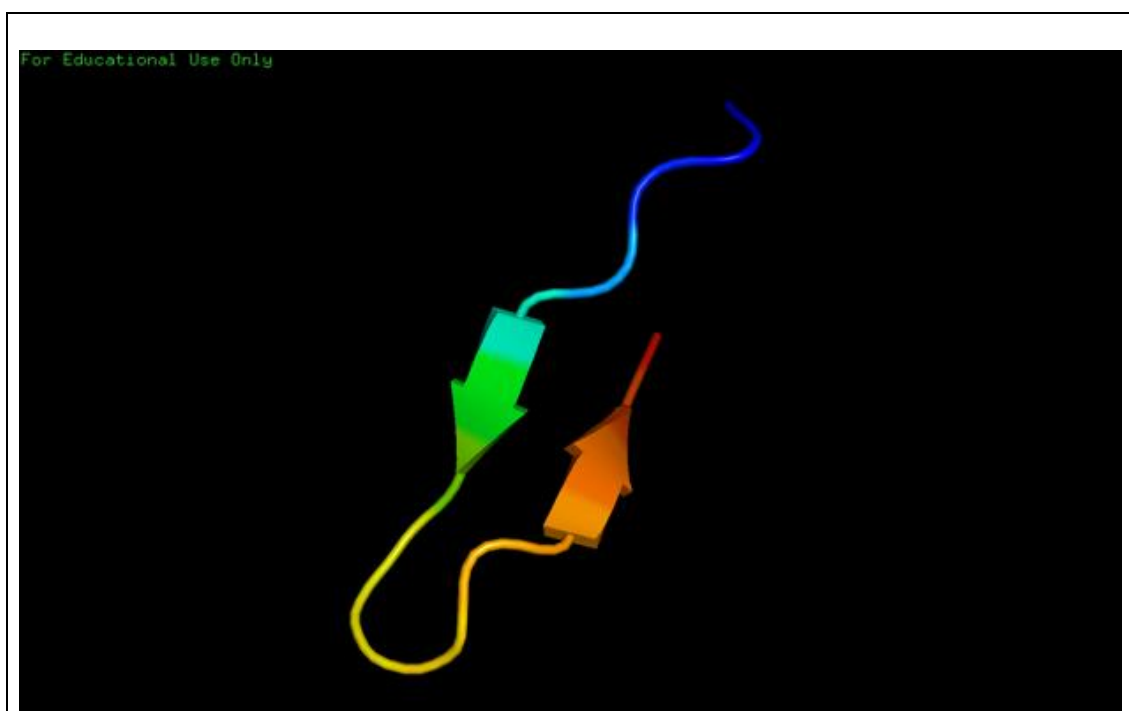
Estructura 3D del epítipo IFLILLYFFSYLGQG



Estructura 3D diseñada por el programa PEPFOLD donde se denota su estructura de cadenas Beta plegadas.

Figura N°3

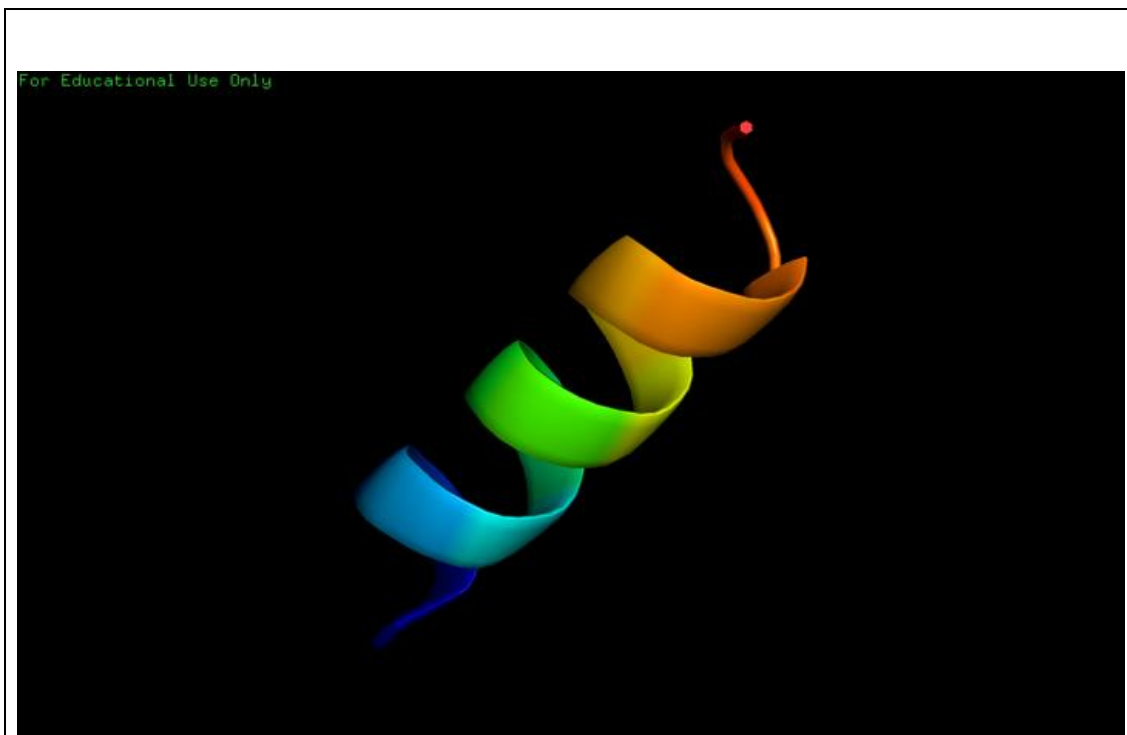
Estructura 3D del epítopo DGKYYYIGSDGQPK



Estructura 3D diseñada por el programa PEPFOLD donde se denota su estructura de cadenas alpha hélices.

Figura N°4

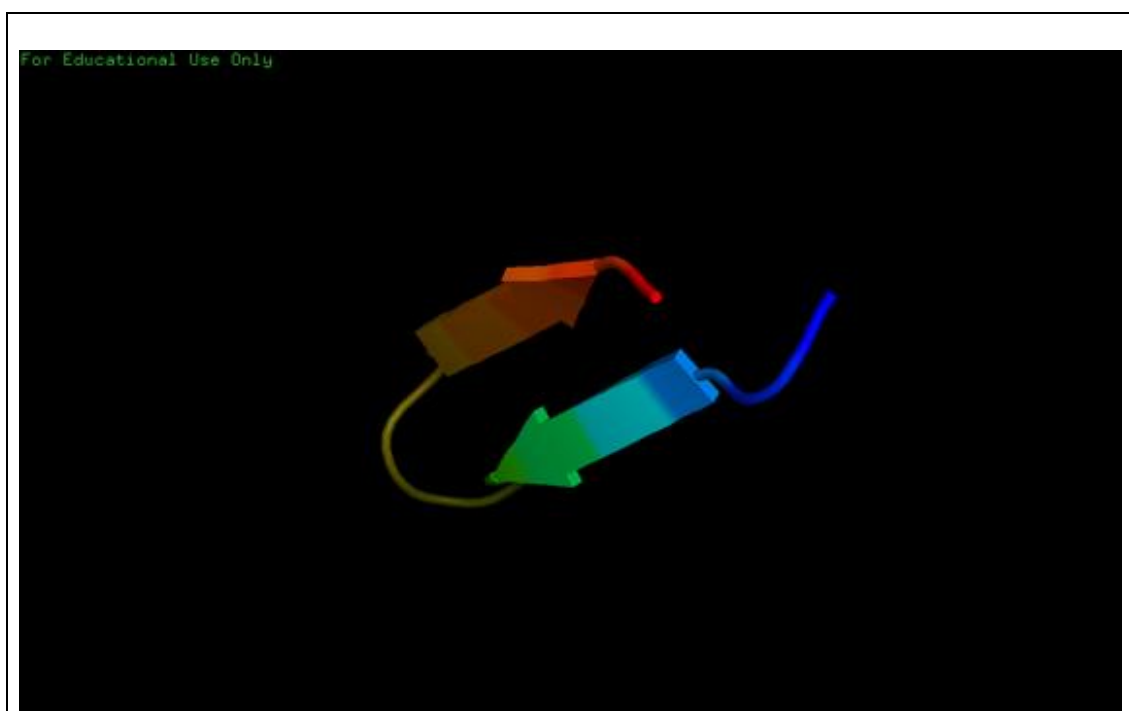
Estructura 3D del epítipo ASDNQDVRVAASNKA



Estructura 3D diseñada por el programa PEPFOLD donde se denota su estructura de cadenas Beta plegadas.

Figura N°5

Estructura 3D del epítipo KVHYYHADSGELQVN



Estructura 3D diseñada por el programa PEPFOLD donde se denota su estructura de cadenas alpha hélices.

Figura N°6

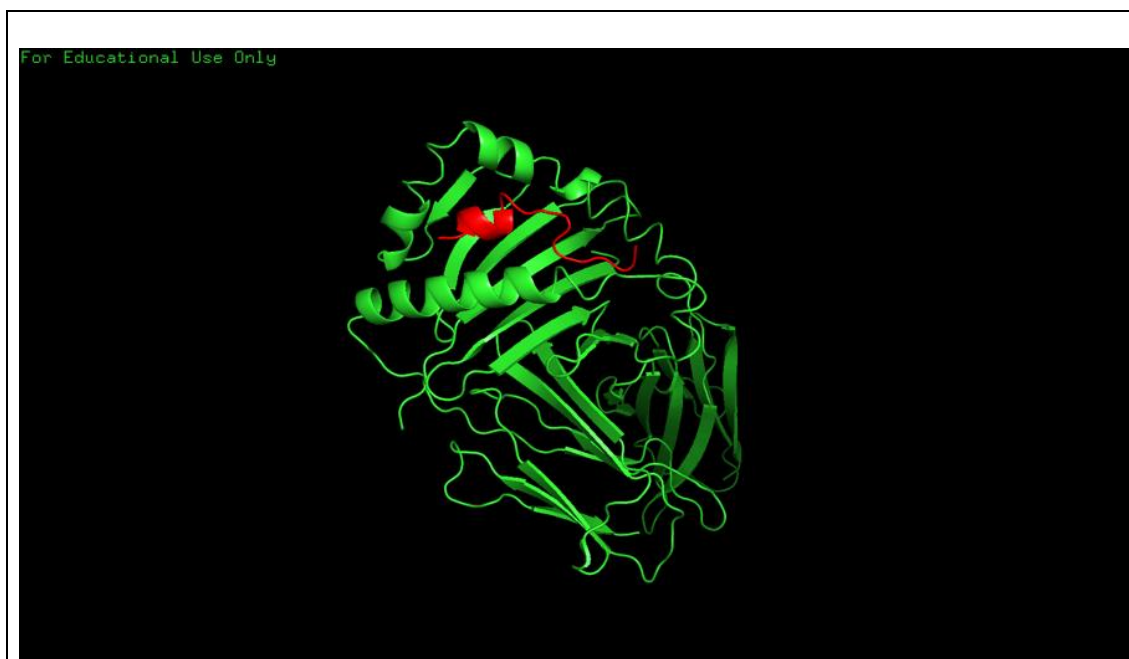
Doking del epítipo KFLQTLFYSVIFLI con el complejo de histopatocompatibilidad
MHC2



Epitopo en cuestión con una buena unión a la fenda del complejo de
histocompatibilidad mayor 2.

Figura N°7

Docking del epítipo IFLILLYFFSYLGQG con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2



Epítipo en cuestión con una buena unión a la fenda del complejo de histocompatibilidad mayor 2.

Figura N°8

Doking del epítipo DGKYYYIGSDGQPKK con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2



Epítipo en cuestión con una buena unión a la fenda del complejo de histocompatibilidad mayor 2.

Figura N°9

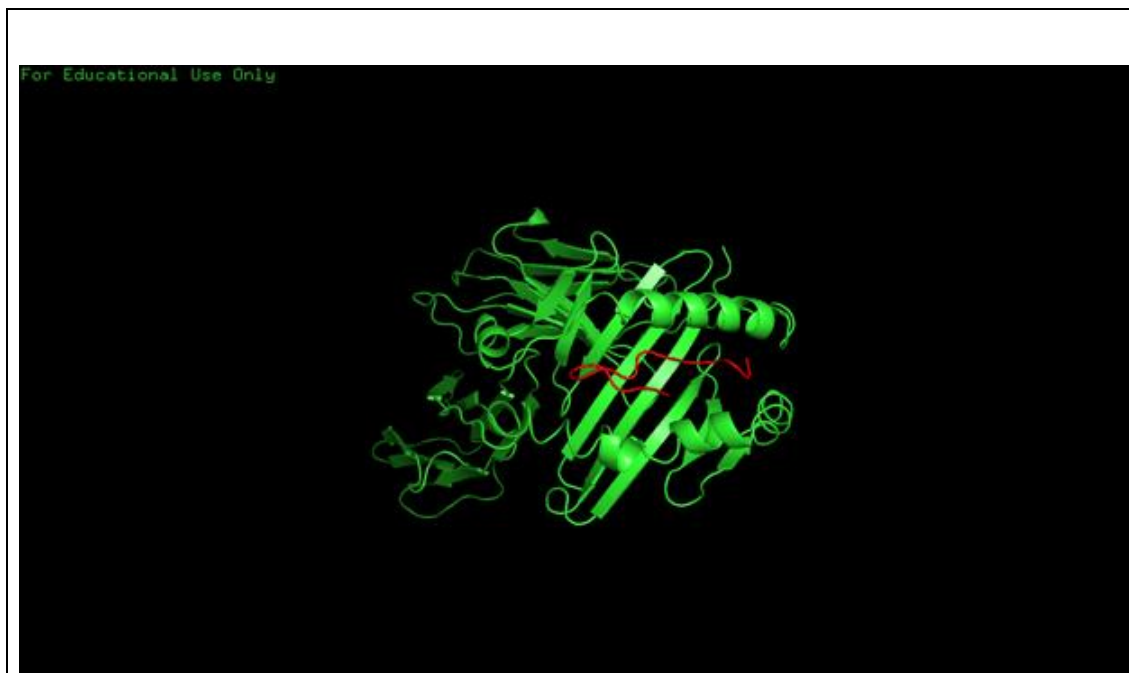
Docking del epítipo ASDNQDVRVAASNKA con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2.



Epítipo en cuestión con una buena unión a la fenda del complejo de histocompatibilidad mayor 2.

Figura N° 10

Docking del epítipo KVHYYHADSGELQVN con el complejo de histopatocompatibilidad MHC2.



Epítipo en cuestión con una buena unión a la fenda del complejo de histocompatibilidad mayor 2.

Figura N° 11

Diseño 3D de la vacuna multiepítopo

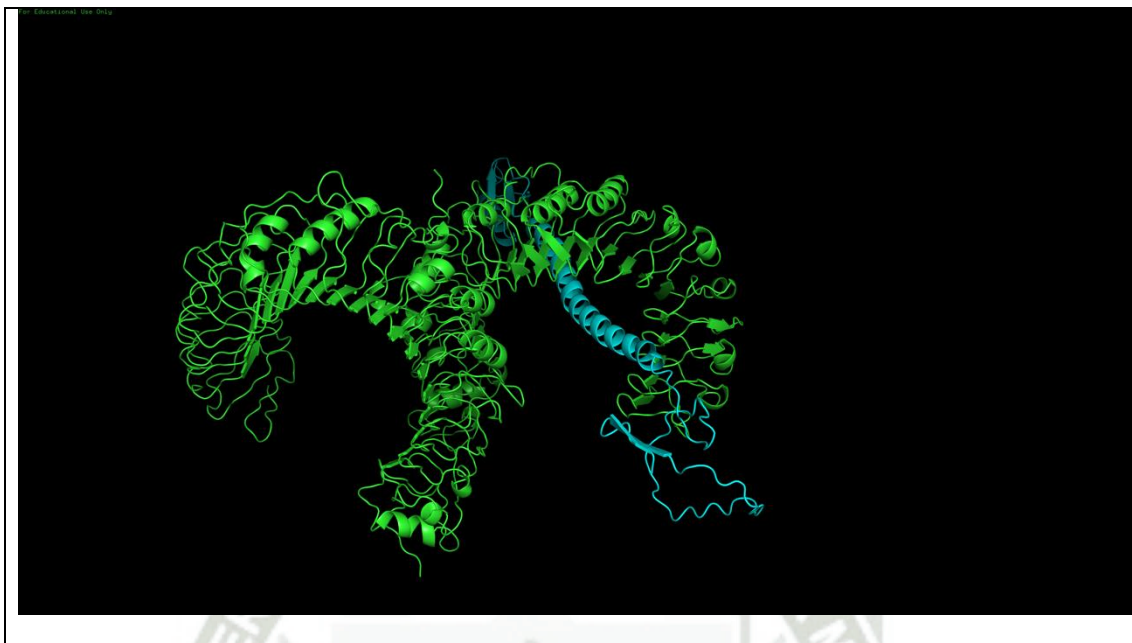


Diseño 3D del candidato a vacuna teniendo la siguiente estructura: coadjuvante (en verde), linker (en rojo) epítomos de la proteína DltX (en azul) y epítomos de la glucosiltransferasa (naranja)

GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKKEAAAKKFLQLTFY
SVIFLIEAAAKIFLILLYFFSYLGQGEAAAKDGKYYYIGSDGQPKKEAAAKASDNQDVR
VAASNKAEAAAKKVHYYHADSGELQVN

Figura N° 12

Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el TLR2



Candidato a vacuna multiepítipo siendo reconocida por el TLR2, con una consecuente activación del sistema inmune.

Figura N° 13

Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el TLR4



Candidato a vacuna multiepítipo siendo reconocida por el TLR4, con una consecuente activación del sistema inmune.

Figura N° 14

Predicción de reconocimiento del candidato a vacuna con el BCR



Candidato a vacuna multiepítipo siendo reconocida por el BCR, con una consecuente activación del sistema inmune.

DISCUSION

Se entiende por caries, una enfermedad infecciosa de carácter multifactorial que fundamenta su mecanismo de patogenicidad en la teoría quimio parasitaria que establece que la desmineralización del tejido duro se produce por la acción de los sub productos ácidos de desecho agregados por las bacterias, lo que genera una alteración del PH del medio y por consiguiente genera el daño estructural característico de la mencionada enfermedad.

La caries dental es causada por la placa bacteriana, también conocida como biofilm bacteriano, que se compone de dos elementos fundamentales: la matriz y la comunidad bacteriana.

En primer lugar, hablemos de la matriz. Esta es una película pegajosa que se adhiere a las superficies del diente y permanece en ellas a menos que se produzca un estímulo mecánico que la elimine, como el cepillado. Compuesta inicialmente por mucina, la matriz se enriquece con dextranos y exopolisacáridos que las bacterias secretan, lo que incrementa su capacidad de adherencia.

El segundo componente del biofilm es la comunidad bacteriana, que puede ser aerobia o anaerobia dependiendo de si coloniza áreas supra o subgingivales. Esta diferenciación está relacionada con la etiología tanto de la caries como de las enfermedades periodontales.

El biofilm atraviesa un proceso de maduración que se divide en tres etapas: primero, la adhesión de especies pioneras; segundo, la producción de polisacáridos extracelulares; y finalmente, la disociación de las bacterias del biofilm, lo que permite su propagación en el medio ambiente.

En la investigación M.Patel nos habla de Las vacunas sintetizadas utilizando estos factores de virulencia antigénica pueden reducir el número de estreptococos mutantes en la placa y, por lo tanto, reducir las posibilidades de desarrollar caries dental. Estudios in vitro e in vivo (animales y humanos) han establecido que estos anticuerpos pueden aumentar los niveles de IgA secretora específica del antígeno y reducir el número de Strep. mutans en la placa dental (Koga et al. 2002). La IgA secretora puede actuar contra la caries dental bloqueando la colonización de Strep. mutans en la superficie del diente. Las inmunoglobulinas G y M están menos involucradas en la defensa contra la caries

(28). El presente estudio de investigación apoya estos resultados teniendo en cuenta que, se observó que las bacterias objeto del presente trabajo de investigación, son las que pertenecen al género *Streptococcus* Viridans, más en concreto, el *Streptococcus Mutans*, una bacteria en forma de coco, inmóvil, gram positiva, que tiene la capacidad de poder segregar ácido láctico, lo que va a generar un cambio en el nivel e PH del medio oscilando entre los 4.2 y 7; el potencial patogénico de dicha bacteria para genera la enfermedad caries se ve incrementada tras una infección previa del *Streptococcus Sabrinus*.

En la investigación realizada por Gayathri Cherukuri, Chandrasekhar Veeramachaneni, Rao G.V, Venkat Baghirath Pacha , Sudheer B Balla; en el estudio nos aporta que, el advenimiento de varios anticuerpos contra los antígenos de los estreptococos mutans, la inmunización pasiva local se ha convertido en el enfoque más seguro en los seres humanos contra la colonización de bacterias y la inducción de caries. Esta revisión proporcionó información sobre la epidemiología, la inmunización activa y pasiva en ensayos con animales y humanos, así como las perspectivas de la vacunación contra la caries (29). Es por ello que el presente estudio de investigación apoya estos resultados sabiendo que, El potencial cariogénico del *Streptococcus Mutans* radica en sus factores de virulencia, entendiéndose por estos, un conjunto de estructuras o mecanismos que permiten la supervivencia y favorecen la colonización del microorganismos; en estado estricto, en el caso del *Streptococcus Mutans* nos referimos principalmente a un conjunto de proteínas dentro de las cuales encontramos al Glucociltransferasa, Fructuociltransferasa y DITX, donde esta última es parte constituyente de la pared celular, una estructura fundamental en el revestimiento de la bacteria, no solo como parte y elemento de contención de factores de virulencia, sino también como un mecanismo de defensa contra el medio externo, como la presión osmótica, lo que garantiza la supervivencia bacteriana.

Para el diseño y elaboración de mi diseño de vacuna se hizo una extensa búsqueda bibliográfica para poder determinar los principales factores de virulencia del *Streptococcus Mutans*, de los cuales se eligió a los más virulentos y trascendentes. El glucociltransferasa, que tiene la función de generar la adherencia de las bacterias a partir de la metabolización de la glucosa y la posterior secreción de exopolisacáridos; y la DITX que es un elemento constituyente de la pared celular.

Una vez identificado ambos factores de virulencia, se procedió a realizar la búsqueda de su proteoma o estructura proteínica en National Library of Medicine; en dicha estructura se muestra toda la secuencia de aminoácidos que componen la proteína de los factores de virulencia antes mencionados.

Posteriormente se llevó a cabo el alineamiento de proteínas, en donde se buscó elementos que guarden determinado grado de similitud entre las estructuras, para dicha labor se utilizó el servidor Cloustral Omega utilizando los parámetros predeterminados.

Con este último paso se logró individualizar los epítomos de glucociltransferasa y DltX, siendo necesario recordar que un epítomo es una parte del antígeno que tiene la función de ser reconocido por la región variable del anticuerpo para posteriormente unirse a este, formar un paratopo y esto genere como consecuencia la formación del complejo antígeno anticuerpo que activara la respuesta inmune.

De glucociltransferasa se obtuvo los epítomos KFLQLTLFYSVIFLI, IFLILLYFFSYLGQG Y DGKYYYIGSDGQPKK; mientras tanto de DltX se obtuvieron los siguientes epítomos ASDNQDVRVAASNKA y KVHYYHADSGELQVN.

Dichos epítomos tuvieron que ser sometidos a una evaluación de antigenicidad, alergenicidad y toxicidad.

La antigenicidad, indica que la estructura tiene el potencial para comportarse como tal, para que de esta manera se pueda dar la formación del complejo, la toxicidad, implica que no pueda causar daño al organismo por efectos nocivos y la alergenicidad, corresponde a que no exista posibilidad de poder generar un alteración o reacción autoinmunitaria.

Una vez realizado el testeo se tiene que llevar a cabo e modelado del plegado, para lo cual se utilizó Alpha Fold server, que después de someter al epítomo, genero un modelo extraíble en formato CIF, el cual se exporto y posteriormente se extrajo para poder someterlo a un software de generación de modelos 3D, el Pymolwin, con esto se consiguió el modelo 3D del epítomo y también su conversión de formato de CIF a PDB.

Con esto lo siguiente en hacer es llevar a cabo el acople del epítomo al MHC2; es preciso recalcar que el complejo mayor de histocompatibilidad es de 3 clases en el ser humano MHC1, MHC2 y MHC3, donde el ultimo está constituido por proteínas circulantes,

mientras que los dos primeros están constituidos por proteínas acopladas a membrana de los linfocitos T citotóxicos (MHC1) y linfocitos T colaboradores o Helper (MHC2).



CONCLUSIONES

Bajo los límites de este estudio se ha podido concluir:

PRIMERO

Que sí hay epítomos con características antigénicas para la proteína DltX.

SEGUNDO

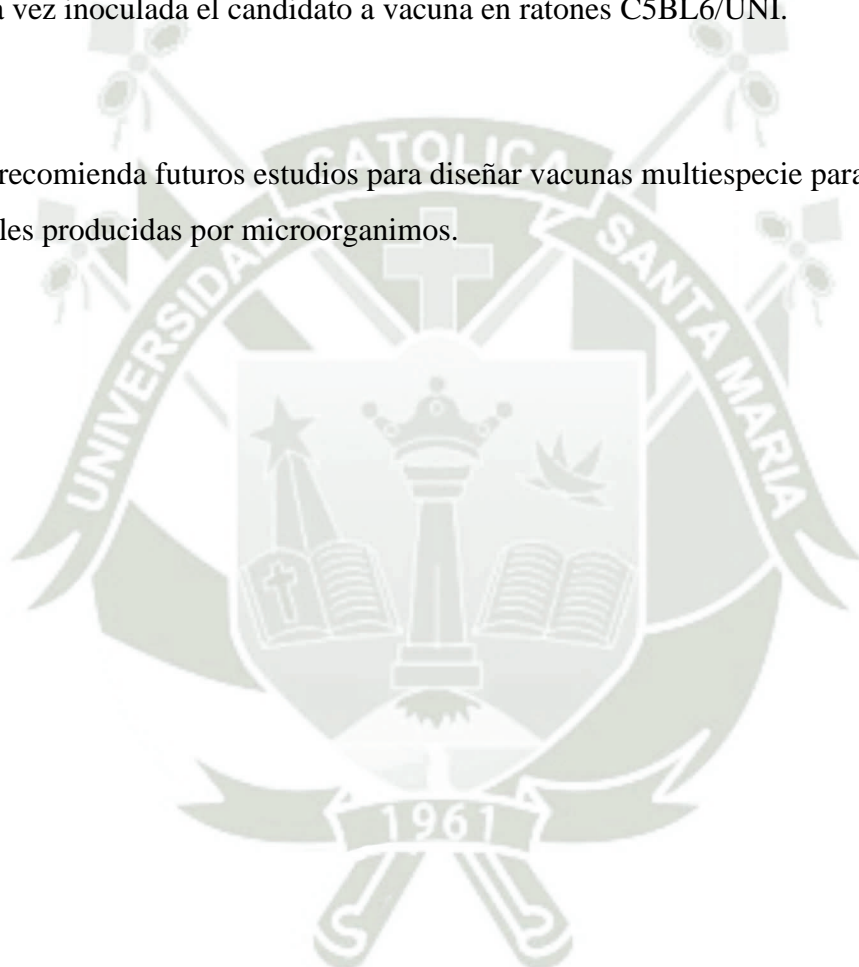
Que sí hay epítomos con características antigénicas para la proteína glucosiltransferasa.

TERCERO

Sí es posible diseñar una vacuna multiepítomo altamente antigénica capaz de generar una respuesta inmunológica vía reconocimiento por TLR2, TLR4 y BCR.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios in vivo para verificar la producción de anticuerpos una vez inoculada el candidato a vacuna en ratones C5BL6/UNI.
2. Se recomienda futuros estudios para diseñar vacunas multiespecie para lesiones orales producidas por microorganismos.





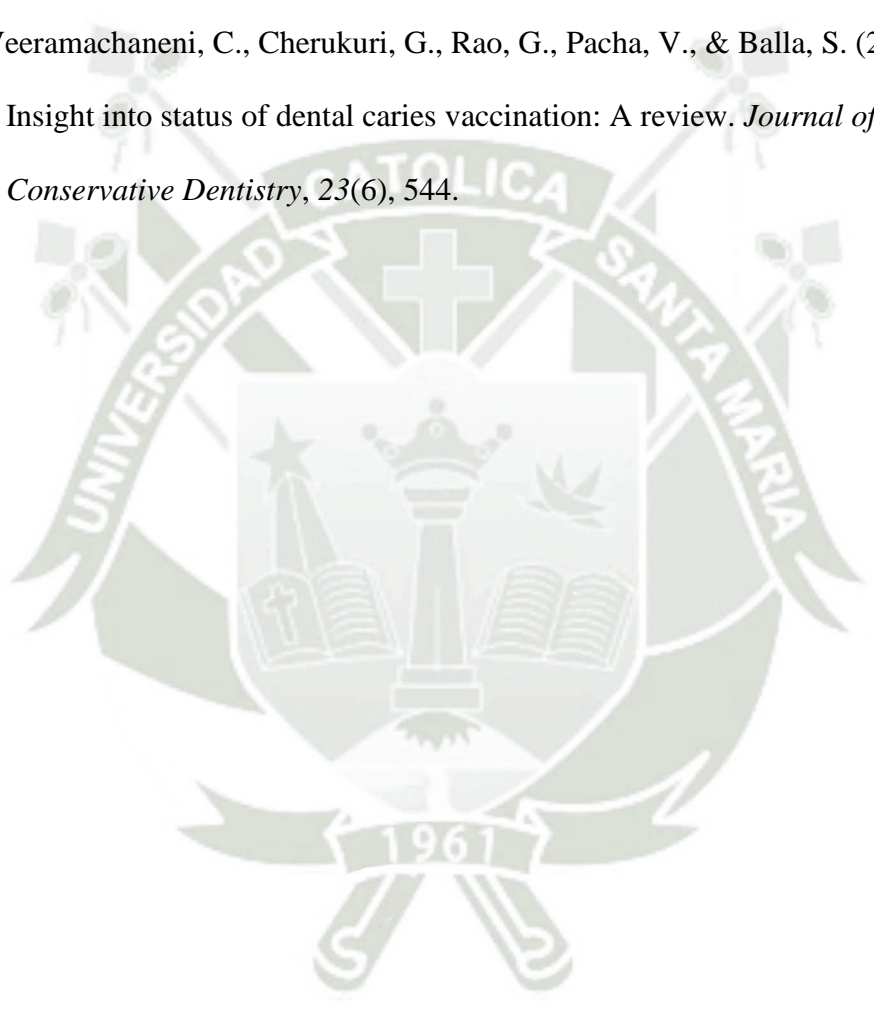
CAPITULO IV: REFERENCIAS Y ANEXOS

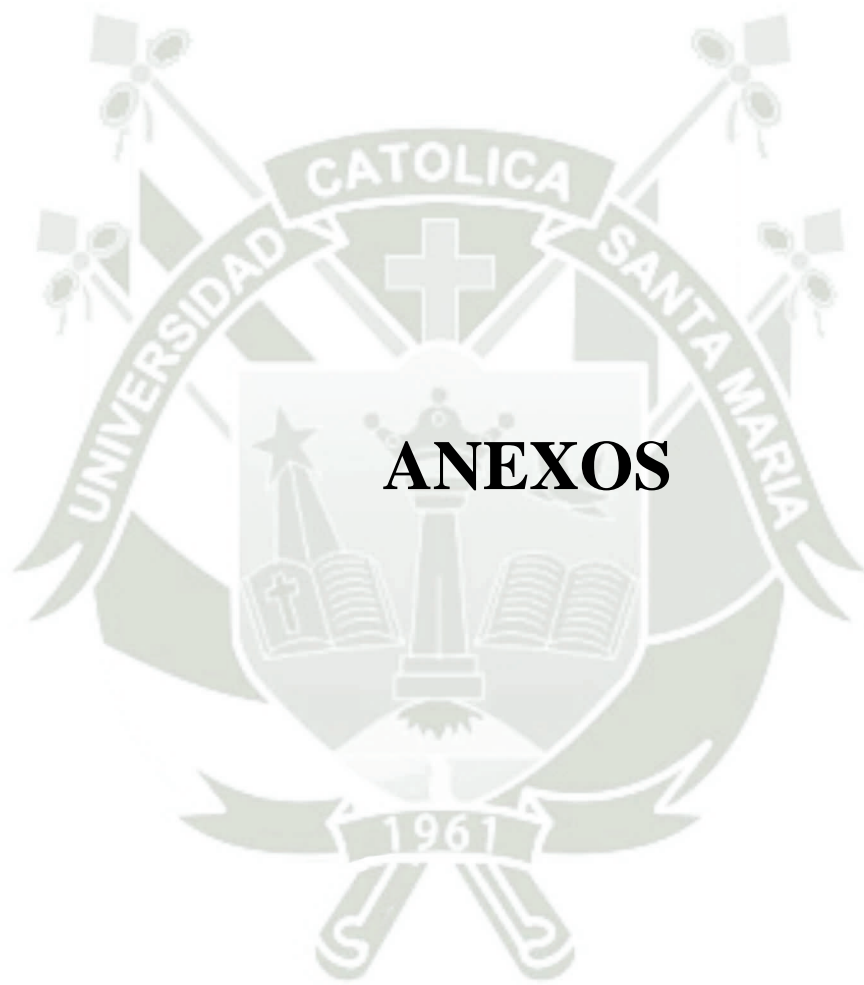
REFERENCIAS

1. Philip N, Suneja B, Walsh L. Beyond Streptococcus mutans: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British dental journal*. 2018;224(4):219-25.
2. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. *Microbiological reviews*. 1980;44(2):331-84.
3. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiology spectrum*. 2018;6(5).
4. Bratthall D. A Streptococcus mutans Safari! *Journal of dental research*. 1997;76(7):1332-6.
5. Ravikumar D, Ramani P, Gayathri R. Genotypic diversity of Streptococcus mutans in children with and without early childhood caries- A systematic review. *Journal of oral biology and craniofacial research*. 2021;11(2):308-12.
6. Forssten SD, Bjorklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients*. 2010;2(3):290-8.
7. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Polish journal of microbiology*. 2014;63(2):127-35.
8. Matsumoto-Nakano M. Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. *The Japanese dental science review*. 2018;54(1):22-9.
9. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33(4):499-515.
10. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology 2000*. 2021;86(1):32-56.
11. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2019;38(11):2005-19.
12. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2021;52(4):1701-18.

13. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual review of microbiology*. 2000;54:413-37.
14. Wang Y, Bian Z, Wang Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Applied microbiology and biotechnology*. 2022;106(19-20):6365-81.
15. Sedghizadeh PP, Mahabady S, Allen CM. Opportunistic Oral Infections. *Dental clinics of North America*. 2017;61(2):389-400.
16. Eggertsson H, Ferreira-Zandona A. Dentition and lesion history. *Monographs in oral science*. 2009;21:102-12.
17. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dental clinics of North America*. 2017;61(2):199-215.
18. Kohler B, Andreen I, Jonsson B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* in their children. *Archives of oral biology*. 1984;29(11):879-83.
19. Kohler B, Birkhed D, Olsson S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries research*. 1995;29(5):402-6.
20. Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK. The Nature of Selection on the Major Histocompatibility Complex. *Critical reviews in immunology*. 2017;37(2-6):75-120.
21. Allcock RJ. The major histocompatibility complex: a paradigm for studies of the human genome. *Methods in molecular biology*. 2012;882:1-7.
22. Van Kaer L. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. *Tissue antigens*. 2002;60(1):1-9.
23. Krovi SH, Gapin L. Structure and function of the non-classical major histocompatibility complex molecule MR1. *Immunogenetics*. 2016;68(8):549-59.
24. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *International review of cell and molecular biology*. 2019;348:69-121.
25. Pishesha N, Harmand TJ, Ploegh HL. A guide to antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology*. 2022;22(12):751-64.
26. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Alvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noe F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins:

- Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*. 2017;8:292.
27. Obando-Pereda G. Can molecular mimicry explain the cytokine storm of SARS-CoV-2?: An in silico approach. *Journal of medical virology*. 2021;93(9):5350-7.
28. Patel, M. (2019). Dental caries vaccine: are we there yet? *Letters in Applied Microbiology*, 70(1), 2–12.
29. Veeramachaneni, C., Cherukuri, G., Rao, G., Pacha, V., & Balla, S. (2020). Insight into status of dental caries vaccination: A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 23(6), 544.





Anexo N° 1

Tabla de Predicción de epítomos para MHC-2y su respectiva antigenicidad, toxicidad y alergenicidad.

S/N	Core Peptide	Length	MHCII Alleles	Score/Percentile	Antigenicity	Toxicity	Allergenicity
1							
2							
3							
4							
5							