

Especial: Investigación básica en caries dental

Glucosiltransferasas: su importancia en el desarrollo de la caries

Glucosyltransferases: their role in cariogenesis

Silvia Barrientos Sánchez*

Univ Odontol 2004 Jun-Dic; 24(54-55):132-136

RESUMEN

La caries dental es una enfermedad ampliamente estudiada que se encuentra directamente relacionada con la presencia de *Streptococcus mutans*, cuyos factores de virulencia más relevantes son la proteína de adhesión (PAC) y las glucosiltransferasas (GTF). Estas últimas son enzimas mediadoras de la producción de glucanos, que permiten la cohesión y maduración de la biopelícula dentobacteriana. Dado el importante papel que estas enzimas tienen actualmente como posible agente de una vacuna contra la enfermedad, este artículo busca revisar los aspectos de mayor relevancia que permitan comprender la estructura y función de estas proteínas.

PALABRAS CLAVE

Caries dental, *Streptococcus mutans*, factores de virulencia, glucosiltransferasas, vacuna anticaries

ÁREAS TEMÁTICAS

Microbiología oral, cariólogía

ABSTRACT

Dental caries is a well-studied disease. The cariogenic process is mainly related to *Streptococcus mutans*, a microorganism that has two relevant virulence factors: the surface protein antigen (PAC) and the glucosyltransferases (GTFs). GTFs are enzymes that catalyze production of glucans, relevant in the cohesion and growing of dental biofilm. The research of a vaccine against dental caries has focused on GTFs as one of those possible agents. In this paper, function and structure of GTFs are described.

KEY WORDS

Dental caries, *Streptococcus mutans*, virulence factors, glucosyltransferases, anticaries vaccine

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa, crónica y transmisible, que destruye los tejidos duros del diente por los ácidos producto de la fermentación de carbohidratos derivados del metabolismo bacteriano. Los microorganismos se adhieren al diente, se agregan en la superficie dental y producen metabolitos que a su vez degradan la parte orgánica y la fracción inorgánica del esmalte. Desde el siglo XIX, se ha relacionado la dieta con la evolución de la enfermedad, y con base en los principios generales de infección dados por Pasteur y Koch, se inició el análisis del factor microbiano en la caries. Los primeros estudios en primates indicaron la asociación directa con dos microorganismos: *S. mutans* y Lactobacilo. Durante los años treinta, se consideró que definitivamente es este último el principal agente causal de la caries, y se le vio como un posible vacunógeno. En los años sesenta, se retomó al estreptococo como el mediador microbiológico más importante en la etiología de la patología, gracias al desarrollo de modelos animales óptimos, técnicas de aislamiento de proteínas e identificación de inmunoglobulinas en saliva. Crisley identificó enzimas importantes en el metabolismo bacteriano, como las dextranacarasas, más tarde llamadas glucosiltransferasas (GTF), con lo que se dio comienzo a la investigación acerca de los factores de virulencia de *S. mutans*, abriendo la posibilidad de la vacuna contra la caries.¹ Inicialmente, se describieron dos clases de GTF, una que permitía la formación de glucanos insolubles GTF B y otra que formaba glucanos solubles GTF D; en la actualidad se reconoce una tercera enzima, GTF C, que sintetiza ambas clases de

* Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia. Estomatóloga, magistra en microbiología, profesora asistente, investigadora, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D. C., Colombia.

glucanos, asumiéndose que la acción conjunta de las tres enzimas es necesaria para la máxima actividad cariogénica. Por otra parte, estas enzimas han sido reconocidas en varias especies de estreptococos como *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. downei* y *S. mutans*, siendo las de este último las más estudiadas por estar relacionadas directamente con la iniciación del proceso cariogénico.

Dentro de sus procesos metabólicos, *S. mutans* forma, a partir de sacarosa y glucosa, y con la ayuda de las GTF, glucanos que son polisacáridos de la glucosa con enlaces $\alpha 1,6$ (o dextranos) y $\alpha 1,3$ (también llamados mutanos). Su estructura bioquímica les confiere la capacidad de ser solubles a los primeros e insolubles a los segundos. Esta propiedad permite que la bacteria se agregue y se adhiera, formando la placa dental que, a medida que va progresando, se va haciendo más patagénica y menos susceptible al ataque por los agentes externos.²

ANATOMÍA FUNCIONAL DE LAS GTF

Las GTF son proteínas de gran tamaño que se encuentran, bien unidas a la membrana bacteriana o bien en el medio extracelular. Pertenecen la familia de las llamadas (B/a) 8 barrel similares a las alfaamilasas. Cada proteína tiene una región catalítica asociada al carbono N terminal SDB y en el extremo C terminal se encuentra la GPD o dominio de unión a glucanos.²⁻⁵

Se encuentran tres tipos de GTF: 1) GTF I o B, que es la que desdobra los azúcares para producir glucanos insolubles; está compuesta por 1424 aminoácidos, tiene un peso molecular de 148 KDa, un punto isoeléctrico de 6.4 y un pH óptimo de 6.0. 2) GTF IS o C, que produce tanto glucanos insolubles como solubles y fructuosa libre; tiene 1375 aminoácidos, 5.1 de punto

isoeléctrico y un pH óptimo de 6.5. 3) GTF S o D, que solamente produce glucanos solubles; tiene 1430 aminoácidos, un punto isoeléctrico de 6.5 y un pH óptimo de 5.5.

Son proteínas que pueden catalizar la reacción para el metabolismo de la sacarosa y unirse a los glucanos. La primera capacidad se encuentra en el dominio SDB asociado al grupo N terminal, mientras que la habilidad de unión al glucano está en el otro dominio, el grupo C terminal de la enzima.⁵ Estas enzimas tienen secuencias de aminoácidos homólogas hasta en un 75%, y la diferencia entre ellas radica en varios aminoácidos que le confieren a cada una actividad distinta por su conformación espacial y química. La actividad catalítica, es decir, la de la región SBD, no está claramente dilucidada desde el punto de vista funcional, aunque su secuencia es conocida; los estudios moleculares evidencian que la presencia de aminoácidos como Asp 413, Asp 451 o Hist 561 y Trip 491, en los residuos 446-454, es esencial para que la reacción enzimática se produzca, ya que alguno de éstos actúa como donador de protones, estando en determinada conformación espacial. Así, la enzima cliva la sacarosa incorporando un grupo glucosil en los polímeros cortos de glucosa con enlaces $\alpha 1,3$ o $\alpha 1,6$.^{6,7} Se han identificado regiones conservadas de 19 aminoácidos en las GTF B y C, que son funcionalmente importantes para la actividad enzimática y la adherencia, donde Asp 411 es vital para estas funciones; anticuerpos dirigidos contra esta secuencia reducen la actividad cariogénica de las cepas. Las observaciones de Smith y colaboradores evidencian la existencia de subdominios catalíticos con contenidos de glutamato y triptofano o aspartato e histidina, que están involucrados en la actividad catalítica de las GTF. Además, estas secuencias tienen epítopes antigénicos importantes, ya que pueden producir

repuestas inmunes capaces de interferir en la síntesis de glucanos. Mientras se conserve en las preparaciones antigénicas la región N terminal, que es la funcionalmente activa, se mantiene la capacidad de adhesión del microorganismo.^{7,8}

El dominio C terminal de las GTF es el responsable de la unión a los glucanos y está compuesto por una serie de seis secuencias repetitivas de aproximadamente 65 aminoácidos del 1096-1475, que han sido clasificadas en cuatro distintas clases según su similitud, lo que parece tener importancia desde el punto de vista funcional y es posible que éstos se constituyan en epítopes antigénicos claves en el control inmunológico de *S. mutans*.^{3,8} También se habla de una región poco examinada de los aminoácidos 1176-1194, que puede ser lo que Eto y colaboradores denominan un péptido de autoinhibición, que actúa inutilizando la enzima por una acción bifásica de proteína a proteína.²

Los estudios fisicoquímicos muestran que son proteínas enzimáticamente activas en estado de adsorción y la naturaleza de sus productos puede influir en la adherencia a una película experimental.⁹ Su diferente conformación en estados de solución le confiere otras características a los glucanos que sintetiza. Inclusive se explica que un anticuerpo dirigido contra una GTF en solución podría no actuar de la misma forma si la enzima está en estado de adsorción, ya que no dejaría al descubierto los mismos epítopes conformacionales. Está comprobado que las condiciones de pH y temperatura influyen notablemente en la mayor o menor actividad de las enzimas; así, el pH óptimo de actividad está entre 5.5 y 6.5, mientras que la temperatura de 40°C da la mayor eficacia, y al reducir la temperatura a 20°C se disminuye la actividad enzimática.⁶

La película salival contiene varias proteínas y glicoproteínas que pueden interactuar las unas con las otras.¹⁰ Los experimentos de Vacca muestran cómo se da la interacción de la alfaamilasa con las GTF, tanto en solución como en superficies de hidroxiapatita. La amilasa es una enzima salival que permite la catálisis del almidón y el glucógeno por rompimiento de los enlaces glicosídicos, permitiendo la liberación de maltosa y maltodextrinas. En presencia de glucosiltransferasas, éstas están inhibidas especialmente por la GTF D; dichas interacciones pueden influir en la formación de placa bacteriana y por ende en la patogénesis de la caries.¹¹

GENÉTICA

Genéticamente, la GTF D se codifica en el gen *gtf D* mientras que GTF B y GTF C codifican en los genes *gtf B* y *gtf C* respectivamente; su tamaño es de 4.2-4.4 Kb.¹² Estos dos últimos se transcriben gracias a la acción de un solo promotor, mientras que el gen *gtf D* es independiente.⁵ Munro y colaboradores describen cómo cada uno de los genes *gtf B* y *gtf C* son importantes en la colonización de superficies duras *in vitro*. Un mutante defectuoso en alguno de estos genes, como el V403, muestra que se reduce en un 20-30% la capacidad cariogénica de la cepa, mientras que un mutante de *gtf D* tiene mucha menos incidencia en esta capacidad de adherencia y por tanto se piensa que su actividad en la enfermedad no es tan importante.¹³

La regulación genética para la transcripción de los factores de virulencia de *S. mutans* responde a la necesidad de mantenerse en un medio que varía constantemente sus condiciones fisicoquímicas. Taubman y Wexler han encontrado varios factores reguladores en la transcripción de estos genes, concluyendo que ésta es complicada y que se da en respuesta a múltiples facto-

res ambientales, entre los que se incluyen el patrón de ingesta de comidas, las fuerzas mecánicas, el pH del medio oral, la presencia de defensas del huésped, y la cantidad y composición de los azúcares ingeridos, que se convierten en señales moderadoras de los regulones que afectan la transcripción, translación y secreción de las enzimas, determinando así lo que Wexler llama plasticidad fenotípica.¹⁴

Existe un polimorfismo genético entre las distintas cepas de *Streptococo mutans* de distintos serotipos, según los análisis por endonucleasas de restricción. Esto significa que la enzima está codificada por secuencias genéticas distintas, pero que su producto final tiene la misma función. Los que presentan mayores grados de similitud en este sentido son los serotipos c y e de *S. mutans*. Inclusive, el serotipo c presenta rangos de polimorfismo genético para estas secuencias genómicas que codifican las GTF, lo que hace más complejo el estudio del fenotipo de este microorganismo.¹⁵⁻¹⁸

INMUNOLOGÍA

Dada su estructura proteica, es de esperarse que las GTF se comporten como antígenos ante los cuales exista una respuesta inmune.¹⁹⁻²¹ Existen pocos estudios sobre la respuesta inmune humoral y celular en individuos naturalmente sensibilizados. Chia y colaboradores construyeron péptidos sintéticos con fracciones de GTF y observaron que en individuos libres de caries existía una actividad mayor de anticuerpos de IgA contra estos péptidos, lo que sugiere que sí existe una respuesta inmune protectora en pacientes naturalmente sensibilizados.²² Los anticuerpos policlonales específicamente dirigidos contra las GTF inhiben la acumulación de *S. mutans in vivo* e *in vitro*.^{20, 23} Inicialmente, se probó hacer una vacuna con

toda la proteína pero estos intentos se dejaron de lado por cuanto los anticuerpos inducidos no lograban la óptima respuesta y se corría el riesgo de tener reacciones cruzadas con proteínas cardíacas.¹⁹ Entonces se determinaron las secuencias de aminoácidos de las enzimas que se comportan como epítopes B y T, buscando la posibilidad que puedan ser la base para una vacuna. La construcción de péptidos sintéticos derivados de secuencias conocidas de las GTF que tienen alta homología, y la vacunación con dichos péptidos induce una respuesta de IgA-s e IgG en animales de experimentación, especialmente a la cadena proteica que se pega al glucano que se conoce como GLU y que sirve como adhesina.²⁰ Con la respuesta inmune dada por estos péptidos, se ha logrado reducir la cariogenicidad de las cepas, pero nunca a niveles del 100%. Los anticuerpos producidos van a bloquear sitios específicos de la enzima, lo que disminuye su actividad. Los anticuerpos monoclonales que se preparan contra una enzima específica de especie, e inclusive de cepa, reaccionan con sus homólogos, aunque los resultados sugieren que puede existir reacción cruzada con otras GTF producidas por otras cepas.²¹

Jespersgaard y colaboradores (1999) reportaron la clonación, expresión y caracterización de las regiones CAT del dominio catalítico y GLU de GTF B, representadas en los aminoácidos 253-628 y 1183-1473 respectivamente, regiones contra las cuales se generaron anticuerpos en conejos.⁴ Estos anticuerpos evidencian una actividad estadísticamente significativa en la inhibición de la producción de glucanos insolubles de las cepas de *S. mutans*. Posteriormente, colocaron los antígenos CAT y GLU por vía intranasal, encontrando una respuesta inmune con IgG en suero e IgA específica en saliva, suero, secreciones vaginales y heces. Esto muestra la

posibilidad de inducir una respuesta inmune, tanto sistémica como local, con estos dos polipéptidos.

IMPLICACIONES CLÍNICAS

La importancia de las GTF en la caries no se pone en duda, hoy por hoy. Además de los estudios sobre su estructura, función, regulación y aplicación como posible vacunógeno se ensaya la forma de controlarla, no sólo a través de la respuesta inmune, sino por otros medios fisicoquímicos.

La producción de GTF en especímenes clínicos ha sido poco estudiada. Alaluusua y colaboradores (1997) hacen el aislamiento de 44 cepas de *Streptococcus mutans* de madres e hijos buscando una relación entre la producción y la caries dental; analizaron el ribotipo de los estreptococos de madres e hijos y, al encontrar que existe concordancia de ribotipos entre madres e hijos, suponen una relación vertical de transmisión. En cuanto a la producción de GTF, ésta es variable y que hay una baja producción de GTF C sobre todo en los especímenes obtenidos de los pacientes libres de caries.²⁴ También Mattos y colaboradores han mostrado una alta asociación entre la expresión y actividad enzimática de la GTF B y la presencia de caries dental; encontraron que existe una relación directa entre su producción y el fenómeno cariogénico en niños brasileños.²⁵ Al colocar un disco de hidroxilapatita en la cavidad oral se muestra que hay actividad de las GTF desde los primeros 30 segundos y hasta 20 minutos después. Esto significa que en la cavidad oral estas enzimas pueden tener una actividad constante, aun después de técnicas de higiene oral que hagan un barrido de la biopelícula dental y por tanto su control es esencial para evitar la recolonización microbiana.⁹

Por otra parte, Devulapalle y colaboradores (2000) comprueban cómo la

presencia de iones metálicos como el hierro o el cobre inactivan la enzima, reduciendo la caries dental por la vía de la reacción de Fenton, por una modificación oxidativa en los aminoácidos esenciales para la actividad.¹⁰ Se ha visto que los detergentes no aniónicos, como el Tween 20, no ejercen ningún efecto sobre la GTF o su actividad, mientras que aquellos iónicos, como la clorhexidina o el peróxido de hidrógeno, cambian la conformación bioquímica de la GTF y por tanto sí pueden ser considerados clínicamente como efectivos en el control de la placa bacteriana.²⁶ Asimismo, se han probado distintos agentes que puedan reducir la actividad de las GTF, tanto en estado de solución como en estado de adsorción, observando que productos como iones, hipoclorito y perborato pueden ejercer un control en estado de solución pero en estado de adsorción, como se encuentra en la biopelícula, se disminuye la capacidad de control. La presencia de azúcares como xilitol o sorbitol tampoco tiene influencia sobre su actividad enzimática.²⁷

CONCLUSIÓN

De esta forma, se puede ver que el estudio de las GTF de los distintos microorganismos, en este caso de *S. mutans*, se constituye en uno de los frentes de investigación en busca de un elemento antigénico sobre el cual se pueda desarrollar una vacuna contra la caries dental. También podría pensarse en el control genético o biológico de la proteína, de manera que sólo se neutralice este factor de virulencia, sin eliminar el microorganismo, que forma parte del ecosistema oral del humano, ya que su supresión conduciría probablemente a la proliferación de microorganismos con distintos grados de patogenicidad. A pesar de los grandes avances que se han hecho sobre este tema, aun quedan preguntas importantes por resolver como por qué individuos expuestos en forma natural

a la proteína hacen caries dental si su sistema inmune es efectivo, o si los individuos sin caries tienen algún mecanismo de control inmunológico o no de la actividad de la enzima, o si existen cepas clínicas de *S. mutans* que no la produzcan, cuáles son sus mecanismos exactos de control. La resolución de estas inquietudes llevaría probablemente a solucionar uno de los problemas más grandes de la salud pública en la actualidad: la caries dental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bowen W. Vaccine against dental caries - A personal view. *J Dent Res* 1996; 75(8): 1530-4
2. Eto A, Saido T, Fukushima K, Tomioka S, Imai S. Inhibitory effect of a self-derived peptide on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *J Biol Chem* 1997; 274: 15797-802
3. Giffard P, Jacques NA. Definition of a fundamental repeating unit in Streptococcal glucosyltransferases glucan-binding regions and related sequences. *J Dent Res* 1994 Jun; 73(6): 1133-41
4. Jespersgaard C, Hajishengallis G, Greenway T, Smith D, Russell M. Functional and immunogenic characterization of two cloned regions of *Streptococcus mutans* GTF I. *Infect Immun* 1999 Feb; 67(2): 810-6
5. Smith D, Taubman M, Holmberg C, Eascott J, King W. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* 1993 Jul; 61(7): 2899-905
6. Smith DJ. Antibodies to glucosyltransferase induced by synthetic peptides associated with catalytic regions of alpha amylases. *Infect Immun* 1997 May; 67(5): 2638-42
7. Taubman M, Holmberg J, Smith D. Immunization of rats with synthetic peptide constructs from the glucan binding or catalytic region of mutans streptococcal glucosyltransferase protects against dental caries. *Infect Immun* 1995 Aug; 63(8): 3088-93
8. Tsumori H, Minami T, Kuramitsu H. Identification of essential aminoacids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J Bacteriol* 1997 Jun; 179(11): 3391-6
9. Venkitaraman A, Vacca-Smith A, Kopec L, Bowen W. Characterization of glucosyltransferase B GTF C, and GTF D in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res* 1995 Oct; 74(10): 1695-701
10. Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res* 2001; 80(2): 466-9
11. Vacca-Smith A, Venkitaraman R, Quivey G, Bowen H. Interaction of GTF with alpha-amylase and starch

- on the surface of saliva coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1996; 41(3): 291-8
12. Shiroza T, Kuramitsu H. Construction of a model secretion system for oral Streptococci. *Infect Immun* 1993 Sep; 61(9): 3745-55
 13. Munro C, Michaleck S, Macrina F. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infect Immun* 1991 Jul; 59(7): 2316-23
 14. Wexler D, Hudson M, Burne R. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase and glucosyltransferase operon fusion strains in continuous culture. *Infect Immun* 1993 Apr; 61(4): 1259-63
 15. Chia J, Hsu T, Teng T, Chen J, Hahn L, Yang C. Glucosyltransferase gene polymorphism among *Streptococcus mutans* strains. *Infect Immun* 1991 May; 59(5): 1656-60
 16. Fukushima K, Ikeda T, Kuramitsu H. Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. *Infect Immun* 1993 Jul; 60(7): 2815-22
 17. Yamashita Y, Bowen H, Kuramitsu H. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtf B* and *gtf C* genes. *Infect Immun* 1992 Apr; 60(4): 1618-24
 18. Yamashita Y, Bowen H, Burne A, Kuramitsu H. Role of *Streptococci mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific pathogen-free rat model. *Infect Immun* 1993 Sep; 61(9): 3811-17
 19. Taubman M, Smith D. Effects of local immunization with GTF fractions from *Streptococcus mutans* on dental caries in rats and hamsters. *J Immunol* 1977; 118(2): 710-20
 20. Chia J, Lin R, Chen J, Yang C. Inhibition of glucosyltransferase activities of *Streptococcus mutans* by a monoclonal antibody to a subsequence peptide. *Infect Immun* 1993 Nov; 61(11): 4689-95
 21. Fukushima K, Okada T, Ochiai K. Production, characterization, and application of monoclonal antibodies which distinguish three glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1993 Jan; 61(1): 1323-28
 22. Chia J. Antigenicity of a synthetic peptide from glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* in humans. *Infect Immun* 1997; 65(3): 1126-30
 23. Laloi P, Munro C, Jones K, Macrina F. Immunologic characteristics of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase B sucrose-binding site peptide cholera toxin B subunit chimeric protein. *Infect Immun* 1996 Jan; 64(1): 28-36
 24. Alaluusua S, Gronroos L, Zhux, Saarela M, Matto J et al. Production of GTF by clinical mutans streptococcal isolates. *Arch Oral Biol* 1997; 42(69): 417-4
 25. Mattos RO, Smith DJ, King WF, Mayer PA. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12-to-30-month-old children. *J Dent Res* 2000; 79(6): 1371-77
 26. Kawata S, Torii M, Fujiwara T, Hamada S. Effects of selected surfactants on purified glucosyltransferases from *mutans streptococci* and cellular adherence to smooth surfaces. *J Med Microbiol* 1993; 38: 54-60
 27. Vacca-Smith A, Bowen WH. *In situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 277-91

CORRESPONDENCIA

Pontificia Universidad Javeriana,
Facultad de odontología,
Comité de Carrera.
Carrera 7ª # 40-62,
edificio 26.
Bogotá, D. C., Colombia.
Teléfono: +57-1-3208320,
extensión 2875.
Correo electrónico:
barrien@javeriana.edu.co

Recibido para publicación:
septiembre 26 de 2003.

Aceptado para publicación:
abril 14 de 2004.