



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
ESTOMATOLOGÍA**

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL
VENENO DE ESCORPIÓN *Hadruidoles charcasus*
contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

**PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA**

Autora:

Fernández Montenegro Sandra del Rocío

Asesora:

Dra. La Serna Solari Paola Beatriz

Línea de Investigación:

**Respuestas biológicas aplicadas en terapias
estomatológicas**

**Pimentel – Perú
2019**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL VENENO DE
ESCORPIÓN *Hadruido* *charcasus* contra *Streptococcus*
mutans ATCC 25175”**

Aprobación del informe de investigación

Mg.CD. La Serna Solari Paola Beatriz
Asesora Metodóloga

Dra. Clara Luisa Henckel Sime
Presidente del jurado de tesis

MSc. CD Juan Pablo Portocarrero Mondragón
Secretario del jurado de tesis

Blga. Luz Amalia Zamora Mejía
Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

A Dios quién me guía, día a día con su infinita sabiduría, conocimientos e inspiración en mi preparación profesional.

A mi adorada madre Luz Elina Montenegro Saavedra por su inmenso y dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo para lograr mis metas.

A mi querido padre Luis Alberto Fernández Monteza, por haber inculcado a sus hijos, valores, morales y saber valorar el sacrificio de ellos.

A mis hermanas Cynthia, Fiorella, Adriana y Anderson, por su alentadora inspiración, su comprensión y por siempre estar a mi lado cuando los necesite.

A mi esposo Stewart Díaz Pasapera por darme todo su apoyo, su amor y su paciencia para concluir con una meta más así como todas las que nos faltan juntos.

AGRADECIMIENTOS

Mi Asesor y profesora CD. Paola La Serna Solari, quién me dio la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

Al jurado integrado por la Dra. Clara Luisa Henckel Sime y MSc. Blgo. CD. Juan Pablo Portocarrero Mondragón y la Blga Luz Amalia Zamora Mejía, por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

A todos mis docentes que me formaron y me orientaron en la parte investigativa y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación como profesional.

A mis amigos y colegas quienes, sin estar involucrados, me dieron su apoyo para seguir adelante.

Resumen:

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruidoies charcasus* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se evaluó el efecto en 1 grupo distribuidos en concentraciones de 100 %, 50 % y 25 % del veneno. Se hicieron 5 repeticiones por grupo experimental. La actividad bacteriana se evaluó mediante el método de microdilución. El espécimen bacteriano fue reactivado en caldo nutritivo, para inocularlo en placas de 96 pocillos con Caldo Mueller-Hinton. Al enfrentar el microorganismo a las concentraciones del veneno, se obtuvo botones de crecimiento menor a 2 mm para las concentraciones de 100 %, 50 % y 25 %; sin embargo, las concentraciones no presentaron inhibición total. Se concluye que el veneno de *Hadruidoies charcasus* tienen actividad antibacteriana sobre *S. mutans* ATCC 25175

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, Veneno, *Hadruidoies charcasus* (Fuente: DeCS BIREME)

Abstract:

To determine the in vitro antibacterial activity of the scorpion venom *Hadruidoies charcasus* against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The effect was evaluated in 1 group distributed in concentrations of 100%, 50% and 25% of the venom. Five repetitions were made per experimental group. Bacterial activity was evaluated by the microdilution method. The bacterial specimen was reactivated in nutrient broth, to inoculate it in 96-well plates with Mueller-Hinton Broth. When facing the microorganism at the venom concentrations, growth buttons less than 2 mm were obtained for the concentrations of 100%, 50% and 25%; however, the concentrations did not show total inhibition. It is concluded that the venom of *Hadruidoies charcasus* have antibacterial activity on *S. mutans* ATCC 25175

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Venom*, *Hadruidoies charcasus* (Source: MeSH NLM)

INDICE

Resumen

Abstract

I.	Introducción	1
1.1	Situación problema	2
1.2	Trabajos previos	3
1.3	Teorías relacionadas al tema	6
1.4	Formulación del problema	17
1.5	Justificación e importancia del estudio	17
1.6	Hipótesis	17
1.7	Objetivos	18
1.7.1	Objetivo General:	18
1.7.2	Objetivo Específicos:	18
II.	Material y Métodos	19
2.1	Tipo y Diseño de Investigación.....	19
2.2	Población y muestra	19
2.3	Variables, Operacionalización	19
2.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.	20
2.4.1	Técnicas	20
2.4.2	Instrumento de recolección de datos	21
2.5	Métodos de análisis de datos.	22
2.6	Aspectos éticos.	22
2.7	Criterios de rigor científico.....	22
III.	Resultados	23
3.1	Tablas	23
3.2	Análisis de varianza	24
IV.	Discusión	25
V.	Conclusiones	27
VI.	Recomendaciones	28
VII.	Referencias	29
Anexos		34

I. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de caries es una patología significativa sobre todo en niños en edad preescolar como también adolescentes (1), en las últimas cuatro décadas, la prevalencia y la gravedad de las lesiones cariosas en la dentina en niños de 5 y 12 años han disminuido; el componente de deterioro es muy alto, con la prevalencia más baja entre los niños de 12 años en los países de altos ingresos, que también tuvo la menor prevalencia entre los 35 y los 44 años de edad (2).

Además la caries dental persiste como una de las enfermedades crónicas más prevalentes entre los niños en todo el mundo, es así que a través de un estudio realizado en escuelas primarias en Australia, con la finalidad de determinar los factores que influyen en la caries dental en la dentición primaria en los niños, se asoció con el consumo de chocolate con probabilidades un 52 por ciento más altas (OR = 1.52, IC 95%: 1.19-1.93) de la caries dental primaria (3).

La persistencia de las biopelículas de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral puede provocar la caries dental que hasta la fecha, no hay disponibles terapias anticaries que se dirijan específicamente a las biopelículas de *S. mutans* pero que no alteren el microbioma oral general (4), además que son considerados como los principales microorganismos cariogénicos, por su gran capacidad de formar glucanos, como también ácido, superando las capacidades salivares tamponantes (5).

Por otro lado, varios experimentos han determinado que los venenos de anfibios, reptiles, arácnidos e insectos poseen actividad antibacteriana *in vitro* frente a diferentes bacterias de importancia en salud, sin embargo, su actividad depende tanto de la especie de animal, como del microorganismo evaluado, así se ha reportado que, el veneno de escorpión de otras especies tiene efecto antibacteriano frente a bacterias gram positivas y gram negativas tales como *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Candida albicans* (6-8).

Esto motivó a la formulación de la interrogante ¿Tiene el veneno de escorpión *Hadruido charcasus* actividad antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus mutans*

ATCC 25175, siendo posible la actividad antibacteriana del veneno de escorpión contra *Streptococcus mutans* ATCC 35668, pueda presentar variaciones en sus concentraciones, se planteó el presente estudio cuyo objetivo es, Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, esto por medio del método de microdilución.

1.1. Realidad Problemática.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades bucodentales más frecuentes son la caries, las afecciones periodontales (de las encías), el cáncer de boca, las enfermedades infecciosas bucodentales, los traumatismos físicos y las lesiones congénitas, en términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos tienen caries dental, a menudo acompañada de dolor o sensación de molestia (9).

Asimismo, otros estudios revelaron la prevalencia de caries dental en un 55,6% y con un Índice de Caries Significativo fue de 7,439. Además el patrón de caries mostró que los dientes más comúnmente cariados fueron los segundos molares mandibulares seguidos por los incisivos centrales superiores debido a la falta de cuidado bucal diario, la caries dental es significativamente más prevalente en los niños y los dientes menos afectados fueron los incisivos laterales mandibulares (1,10). Por otro lado se ha evidenciado la prevalencia de caries (73,7%) se ha presentado más alta que lesiones traumáticas (20,9%), asimismo existe una correlación relacionada con la edad entre la caries, dientes faltantes y dientes completos (11)

Los resultados de otros estudios sugirieron una asociación significativa entre los niveles de *S. mutans* y las caries dentales utilizando muestras de placa dental en adultos e indican que la cuantificación de la relación *S. mutans* / Total de *Streptococcus* es efectiva para detectar sujetos con la gravedad de la caries dental (12).

Por lo tanto, se tiene de hallazgo que los tipos de adhesina de *S. mutans* con adhesión independiente de sacarosa a DMBT1 del huésped (es decir, SpaP A, B o C) y colágeno (es decir, Cnm, Cbm) realizado en niños suecos de 12 años de edad, se tuvo la presencia de los subtipos SpaP B y Cnm coincidió con un incremento incrementado de la caries durante 5 años, y su unión a DMBT1 y saliva se correlacionó con las puntuaciones de caries individuales. Los subtipos SpaP B están enriquecidos con sustituciones de

aminoácidos que coincidieron con la caries y la unión y especifican biotipos de *S. mutans* con una mayor tolerancia a los ácidos (13).

Los hallazgos revelan subtipos de adhesina de *S. mutans* que coinciden y predicen las diferencias individuales en el desarrollo de la caries y proporcionan una justificación para la atención oral individualizada (13).

1.2. Trabajos previos.

Nie Y. *et al.* (2012). Los péptidos venenosos del escorpión *Heterometrus spinifer* han sido pobremente caracterizados hasta ahora. Aquí, identificamos una nueva clase de péptidos antimicrobianos de la glándula venenosa de *H. spinifer*, que se denominaron HsAp, HsAp2, HsAp3 y HsAp4, respectivamente. Cada uno de los cuatro péptidos consiste en 29 residuos de aminoácidos, y es catiónico y débilmente anfipático. No muestran una homología significativa con ningún otro péptido conocido y, por lo tanto, representan una nueva familia de péptidos de veneno de escorpiones. El análisis antimicrobiano mostró que HsAp es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con valores MIC de 11.8-51.2 μM . HsAp también puede inhibir el crecimiento del hongo probado. El análisis genómico indicó que los genes de los cuatro péptidos presentan pocos intrones. Nuestros estudios amplían las familias de péptidos antimicrobianos de escorpiones (6).

Zeng XC. *et al.* (2013). Tres nuevos péptidos de veneno libres de cisteína, que se denominaron Pantinin-1, Pantinin-2 y Pantinin-3, respectivamente, se han identificado a partir del escorpión *Pandinus imperator* mediante la estrategia de clonación de cDNA.

El precursor de cada péptido consiste en un péptido señal, un péptido maduro sin puentes disulfuro, y un propéptido ácido con una señal de procesamiento típica. Cada uno de los tres péptidos es una molécula α -helicoidal, catiónica y anfipática con 13 o 14 residuos de aminoácidos. Sus secuencias de aminoácidos son homólogas a las de algunos péptidos antimicrobianos 13-mer aislados de escorpiones. El análisis antimicrobiano mostró que los tres péptidos poseen actividades relativamente fuertes contra bacterias Gram-positivas y un hongo, pero tienen actividades antimicrobianas muy débiles contra bacterias Gram-negativas. El ensayo de toxicidad mostró que los tres péptidos exhiben actividades hemolíticas muy bajas o leves contra los glóbulos rojos humanos. Es interesante ver que Pantinin-3 es capaz de inhibir potentemente el crecimiento de *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) S13, un patógeno que puede causar una

serie de infecciones en humanos; esto sugiere que Pantinin-3 tiene un gran potencial para aplicarse en el tratamiento de infecciones por ERV. Nuestros hallazgos obtienen nuevos conocimientos sobre las relaciones estructura / función de los pequeños péptidos antimicrobianos catiónicos lineales de escorpiones, y proporcionan nuevas plantillas para el diseño de agentes antimicrobianos dirigidos a bacterias patógenas resistentes a antibióticos (7).

Li Z. *et al.* (2014). Los péptidos antimicrobianos han atraído mucho interés como una nueva clase de antibióticos contra una variedad de microbios que incluyen cepas resistentes a los antibióticos. En este estudio, se identificó un nuevo péptido antimicrobiano catiónico Hp1404 del escorpión *Heterometrus petersii*, que es un péptido anfifático α -helicoidal y tiene una actividad inhibidora específica contra bacterias gram-positivas que incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Hp1404 puede penetrar la membrana de *S. aureus* a baja concentración e interrumpe la membrana celular directamente a una concentración muy alta. *S. aureus* no desarrolla resistencia a los medicamentos después de múltiples tratamientos con Hp1404 a una concentración de sub MIC, que posiblemente esté asociada con el mecanismo antibacteriano del péptido. Además, Hp1404 tiene baja toxicidad tanto para células de mamífero (HC50 = 226.6 mg / ml y CC50. 100 mg / ml) como para balb-c (no toxicidad a 80 mg / kg por inyección intraperitoneal y LD50 = 89.8 mg / Kg por inyección intravenosa). Curiosamente, Hp1404 puede mejorar la tasa de supervivencia de los ratones Balb-c infectados con MRSA en el modelo de peritonitis. Tomados en conjunto, Hp1404 puede tener aplicaciones potenciales como agente antibacteriano (8).

Ramírez S. *et al* (2015). Se informa sobre el potencial antimicrobiano de dos nuevos péptidos no unidos a disulfuro, denominados VpAmp1.0 (LPFFLLSLIP-SAISAIKKI, amidated) y VpAmp2.0 (FWGFLGKLAMKAVPSLIGGNKSSSK). Estos son péptidos de 19 y 25 aminoácidos con cargas netas de +2 y +4, respectivamente. Sus secuencias corresponden a las regiones maduras predichas de precursores más largos, supuestamente codificadas por los ADNc derivados de las glándulas del veneno del escorpión mexicano *Vaejovis punctatus*. Ambos péptidos se sintetizaron químicamente y se ensayaron frente a una variedad de microorganismos, incluidas las cepas patógenas de aislados clínicos y cepas resistentes a los antibióticos convencionales. También se sintetizaron y probaron dos variantes más cortas, denominadas VpAmp1.1 (FFLLSLIPSAISAIKKI, amidated) y

VpAmp2.1 (FWGFLGKGLAMKAVPSLIGGNKK). Los ensayos antimicrobianos revelaron que los cuatro péptidos sintéticos inhiben eficazmente el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) y Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), con MIC en el rango de 2.5-24.0 μ M; levaduras (*Candida albicans* y *Candida glabrata*) con CMI de 3.1-50.0 μ M; y dos cepas clínicamente aisladas de *Mycobacterium tuberculosis* -incluido uno multirresistente- con CMI en el rango de 4.8-30.5 μ M. Una comparación entre las actividades de los péptidos originales y sus derivados da una idea del papel estructural / funcional de sus residuos distintivos (14).

Cao L. *et al* (2012). La infección bacteriana representa una amenaza creciente para la salud pública mundial y se necesitan con urgencia nuevos tipos de agentes antibacterianos para responder a la amenaza. El veneno de escorpión contiene series de péptidos bioactivos, entre los cuales el péptido antibacteriano es una parte importante. Aquí, se caracterizó un nuevo péptido antimicrobiano StCT2 de la biblioteca de ADNc de la glándula venenosa del *Scorpiops tibetanus*. El ADNc de longitud completa de StCT2 es de 369 nucleótidos que codifican el precursor que contiene un péptido señal de 24 residuos putativo, un supuesto péptido maduro de 14 residuos, y un propéptido ácido de 37 residuos putativo en el extremo C terminal. Las concentraciones mínimas de inhibición (MIC) de StCT2 para *Staphylococcus aureus* fueron de 6.25-25 μ g / ml, incluidas las cepas resistentes a antibióticos como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM). También se encontró que StCT2 muestra una alta actividad antimicrobiana in vivo por un modelo de ratón de infección por *S. aureus*. StCT2 ejerció su actividad antimicrobiana a través de un mecanismo bactericida rápido. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran la eficacia y el mecanismo general de la acción antimicrobiana StCT2 y el potencial terapéutico de StCT2 como un nuevo péptido antimicrobiano (15).

Guo X. *et al.* (2013). Aquí presentamos dos nuevos péptidos amidated lineal 17-mer (TsAP-1 y TsAP-2) cuyas estructuras se dedujeron de los ADNc clonados a partir de una biblioteca de ADNc derivado del veneno del escorpión amarillo brasileño, *Tityus serrulatus*. Ambos péptidos maduros se caracterizaron estructuralmente después de su ubicación en fracciones cromatográficas de veneno y las réplicas sintéticas de cada una se sometieron a una serie de ensayos biológicos. Los péptidos eran cada uno activo contra microorganismos de prueba modelo pero con potencias diferentes. TsAP-1 fue de baja

potencia contra los tres organismos de prueba (MICs 120e160 mM), mientras que TsAP-2 fue de alta potencia contra la bacteria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (MIC 5 mM) y la levadura, *Candida albicans* (10 mM) . La actividad hemolítica de TsAP-1 fue baja (4% a 160 mM) y, en contraste, la de TsAP-2 fue considerablemente más alta (18% a 20 mM). La sustitución de cuatro residuos de aminoácidos neutros con residuos de Lys en cada péptido tuvo efectos dramáticos sobre sus potencias antimicrobianas y actividades hemolíticas, particularmente las de TsAP-1. Las CIM del análogo catiónico potenciado (TsAP-S1) fueron de 2,5 mM para *S. aureus* / *C. albicans* y 5 mM para *E. coli* pero con un gran aumento asociado en la actividad hemolítica (30% a 5 mM). Las mismas sustituciones de residuos de Lys en TsAP-2 produjeron un efecto dramático en su MIC para *E. coli* disminuyendo esto de > 320 mM a 5 mM. TsAP-1 fue ineficaz contra tres de las cinco líneas celulares de cáncer humano evaluadas, mientras que TsAP-2 inhibió el crecimiento de las cinco. La sustitución del residuo de Lys de ambos péptidos potenció su potencia contra las cinco líneas celulares siendo TsAp-S2 la más potente con valores de IC50 que varían entre 0,83 y 2,0 mM. TsAP-1 y TsAP-2 son péptidos de veneno de escorpión novedosos con actividades antimicrobianas y anticancerígenas de amplio espectro cuyas potencias pueden potenciarse significativamente al aumentar su cationicidad (16).

1.3. Teorías relacionadas al tema.

1.3.1. Caries dental

1. Etiología de la caries

Históricamente, los investigadores se han centrado en los efectos biológicos y dietéticos en la salud oral de los niños para explicar el desarrollo de la caries. En los últimos años, los resultados de salud bucal de los niños utilizan un marco más amplio, que incorpora predictores psicosociales y ambientales, así como los efectos biológicos y dietéticos. Estos marcos generalmente clasifican las afecciones asociadas con la enfermedad en cinco dominios amplios: genética y biología, entorno social, entorno físico, comportamientos que influyen en la salud y atención médica. Estas variables relevantes explican por qué algunos niños, a pesar del uso de flúor y de abundante información acerca de la prevención de caries, desarrollan lesiones cariosas. El modelo de caries de Fisher-Owens y colaboradores incluye diferentes niveles del entorno que

pueden afectar el desarrollo de la caries: nivel infantil; nivel familiar; y a nivel comunitario (17).

1.1. Nivel de niño

La placa visible, la colonización temprana por bacterias relacionadas con la caries, la presencia de estreptococos mutans, la ingesta frecuente de bebidas endulzadas, el cepillado dental poco frecuente, la enfermedad y el uso de antibióticos se han asociado con el desarrollo de caries en niños en edad preescolar.

1.2. Nivel familiar

Las características familiares asociadas con el riesgo de caries en los niños incluyen factores demográficos de la familia, conductas y actitudes de salud oral parental, ansiedad dental y asistencia dental, salud materna y estilo de vida en el embarazo y la primera infancia.

1.3. Nivel comunitario

Es probable que la salud oral de los niños sea mejor en una comunidad que valora la buena salud oral. Los aspectos culturales y el vecindario pueden tener implicaciones para el desarrollo de la caries. El sistema de cuidado dental y la cantidad de cuidado dental disponible pueden afectar la salud oral y el desarrollo de caries en niños en edad preescolar.

2. Evaluación clínica

El examen clínico de los tejidos dentales duros y la biopelícula es un paso importante y determinante en el éxito del tratamiento de la caries. Se debe evaluar y recopilar información sobre las siguientes condiciones:

Cuidado restaurativo previo

El tratamiento restaurador dental previo proporciona un indicador del estado de riesgo de caries pasado y futuro.

Estado de la placa (biopelícula)

La presencia de una biopelícula gruesa y el nivel general de eliminación de placa en la boca son indicadores de riesgo de caries.

Estadificación de las lesiones de caries.

Existen diferentes sistemas para clasificar las lesiones de caries según el grado de desmineralización de la caries en el esmalte y la dentina, y la actividad (activa e inactiva).

Las tres etapas de la caries son: inicial, moderada y extensa / severa. Los criterios para

cada etapa se proporcionan para cada sistema existente en uso o propuesto por diferentes grupos u organizaciones. Este documento describe los siguientes criterios de detección propuestos por diferentes grupos:

Las superficies lisas oclusales, aproximadas y libres de sonido no tendrán visibilidad (código ICDAS 0) o signos radiográficos de caries.

La caries inicial se caracterizará por el primer cambio visual en el esmalte (visto solo después de un secado prolongado al aire o restringido dentro de los confines de un hoyo o fisura)

(Código ICDAS 1) o un cambio visual distintivo en el esmalte (visto en una superficie húmeda o seca) (código ICDAS 2) en superficies oclusales o aproximadas / lisas. En la superficie oclusal, tales lesiones: (i) no serán visibles como radio lucidez, o (ii) la radiolucidez es limitada al 1/3 externo de la dentina en una radiografía intraoral convencional, más comúnmente una vista de mordida. En superficies aproximadas, la mayoría de estas lesiones se caracterizan por una zona de mayor radiolucidez confinada al esmalte, incluidas las lesiones que se extienden hasta la unión dentina esmalte, pero no más allá de este.(18)

La caries moderada se caracterizará clínicamente por un colapso localizado del esmalte (sin signos visuales clínicos de afectación dentinal) (código ICDAS 3) o una sombra oscura subyacente de la dentina (código 4 de ICDAS). Radiográficamente, en la superficie aproximada, la mayoría de las lesiones tendrán una radiolucidez que se extenderá a través del esmalte y hacia el tercio externo o medio de la dentina, algunas pueden aparecer confinadas al esmalte. En la superficie oclusal, aunque la mayoría de las lesiones tendrán una radiolucidez que se extenderá hacia el tercio externo o medio de la dentina, algunas pueden no ser radiográficamente visibles debido a la cantidad de esmalte y dentina bucal y lingual que atenúan el haz de rayos X.

La caries severa se caracterizará por una cavidad distinta con dentina visible (código 5 de ICDAS) o una cavidad distinta extensa con dentina visible que involucre más de la mitad de la superficie del diente (código 6 de ICDAS). Radiográficamente, esto corresponderá a una radiolucidez que se extiende hasta el tercio pulpar de la dentina o llega a la pulpa.

1.3.2. Modelo Teórico Celular de *Streptococcus mutans*

La teoría celular propuesta por los alemanes Theodor Schwann y Matthias Schleiden, ha podido ayudar a la comprensión de los organismos y microorganismos con respecto a su morfología, fisiología y genética. Por tal motivo en el artículo consultado de *Streptococcus mutans* y caries dental de Ojeda, Oviedo y Salas (19).

Morfología y Fisiología de *Streptococcus mutans*

Las cepas de *S. mutans* se pueden clasificar en cuatro grupos serológicos diferentes (c, e, f y k) en función de la composición del polisacárido de rhamose-glucosa de la superficie celular, con ~ 75% de las cepas aisladas de la placa dental que pertenece al serotipo c, ~ 20% para el serotipo e, y el 5% restante clasificado como serotipos f o k (20). Si bien los enfoques bioquímicos y genéticos para diseccionar la biología de *S. mutans* se han utilizado al menos durante las últimas 4 décadas, la publicación de la secuencia completa del genoma de la cepa UA159 de *S. mutans* en 2001(21) cambió drásticamente el panorama y, hoy en día, *S. mutans* es uno de los patógenos Gram-positivos mejor caracterizados.

Metabolismo de los carbohidratos

Como bacteria del ácido láctico (LAB), *S. mutans* depende exclusivamente de la glucólisis para la producción de energía. Una característica distintiva de este organismo es su capacidad para metabolizar una gran variedad de carbohidratos. El genoma de la cepa de tipo UA159 codifica 14 sistemas de fosfotransferasa (PTS) dependientes de azúcar fosfoenolpiruvato con especificidades para varios mono y di-sacáridos, así como dos transportadores de casete de unión a ATP (ABC) involucrados principalmente en la internalización de oligosacáridos(21) . La sacarosa es un disacárido ligado a β 2,1 compuesto de glucosa y fructosa que ha demostrado, por varias razones, ser el más cariogénico de todos los carbohidratos. *S. mutans* ha desarrollado múltiples vías para catabolizar la sacarosa para la producción de ácido (21), y varias enzimas de glicosiltransferasa (Gtfs) convierten la sacarosa en un glucano polimérico extracelular similar al pegamento que promueve la acumulación de biopelículas mediante la unión celular a las superficies dentales y otros microorganismos orales (22).

Formación de biopelículas

Como un importante agente etiológico de la caries dental humana, *S. mutans* vive principalmente en biopelículas en las superficies de los dientes, la llamada placa dental. Las cepas de *S. mutans* producen hasta tres glucosiltransferasas, GtfB, -C y -D, que utilizan el resto de glucosa de sacarosa como sustrato para sintetizar polímeros de glucosa de glucanos (también conocidos como mutantes) (22). GtfB sintetiza glucanos insolubles en agua ricos en enlaces α (1-3), GtfC produce una mezcla de glucanos solubles ricos en enlaces α (1-6) y glucanos insolubles, y GtfD produce glucanos principalmente solubles (a menudo llamados dextrano). Estos polímeros, especialmente los glucanos insolubles en agua ligados a α 3,1, son componentes principales de las matrices de biopelículas de placa. Los Gtfs también se unen a otros microbios orales, incluso aquellos que no expresan naturalmente los Gtfs, convirtiéndolos en productores de glucano de facto (22). Además, *S. mutans* codifica varias proteínas de unión a glucano asociadas a la superficie, GbpA, -B, -C y -D. Juntos, los Gtfs, Gbps y los glucanos adhesivos sirven como un andamiaje integrado para la formación de biopelículas dependientes de sacarosa que es central para la cariogenicidad de este organismo al promover la acumulación local de células microbianas mientras se forma una matriz polimérica limitante de la difusión que protege las bacterias incrustadas.

Tolerancia al estrés

La capacidad de *S. mutans* para adaptarse a cambios ambientales repentinos y sustanciales dentro de la placa dental es un atributo clave que contribuye a su estado como el principal agente etiológico de la caries dental. Los carbohidratos fermentables consumidos por el huésped proporcionan un sustrato para *S. mutans* y otras bacterias del ácido láctico que finalmente resultan en la producción de productos finales ácidos que se acumulan dentro de la biopelícula. Para prosperar con valores de pH bajos, *S. mutans* monta la llamada respuesta a la tolerancia al ácido (ATR), un mecanismo robusto de adaptación transcripcional y fisiológica que abarca la inducción de vías que contribuyen a la amortiguación del citoplasma y los cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana, protegiendo en última instancia la maquinaria celular del daño ácido y que contribuyen a la supervivencia de las bacterias durante el estrés.

Interespecies e interacciones entre reinos

Se han documentado las interacciones entre *S. mutans* y ciertos miembros de la comunidad de la placa dental, y recientemente se ha demostrado que ejercen una gran influencia en el desarrollo y la patogenicidad de la placa. Estas interacciones pueden ser sinérgicas, es decir, promover el crecimiento de *S. mutans*, o antagonistas, es decir, inhibitorias de *S. mutans*. Un ejemplo clásico de una interacción antagónica ocurre entre *S. mutans* y miembros del grupo de estreptococos mitis como *S. sanguinis* y *S. gordonii*. Específicamente, varios miembros del grupo mitis secretan concentraciones milimolares de H₂O₂, que pueden ser altamente inhibitorias para *S. mutans*. Por otro lado, las cepas de *S. mutans* no solo producen mutacinas específicas contra los estreptococos mitis, sino que la mayoría son generalmente más acidúricas que las especies del grupo mitis. Esta relación antagónica se hace más evidente en la placa dental por la cual existe una asociación inversa entre la abundancia de estreptococos comensales orales como *S. sanguinis* y *S. gordonii* (abundante en placa sana) y la de *S. mutans* (abundante en lesiones de caries)

1.3.3. Veneno de escorpión

Péptidos del veneno de escorpión

En cuanto a la composición del veneno de escorpión, éste posee alrededor de 80 toxinas, caracterizadas por ser péptidos de bajo peso molecular, que reconocen canales iónicos y modifican la excitabilidad celular que pueden o no causar toxicidad en mamíferos. Así mismo, el veneno ha demostrado ser una fuente rica de moléculas bioactivas, especialmente los bloqueadores de canales iónicos; en los últimos años se ha reconocido cada vez más que venenos de escorpión también tienen un abundante suministro de péptidos antimicrobianos (AMP) (24) y, se ha sugerido, que la presencia de péptidos antimicrobianos (AMP) podría proteger a la glándula del veneno de la infección y facilitar la acción de otras neurotoxinas.

Los péptidos antimicrobianos del veneno de escorpión son anfipáticos de carga positiva y pueden estar convenientemente divididas en tres categorías estructurales: péptidos conteniendo cisteína con puentes disulfuro, péptidos con una α -hélice anfipático pero con la ausencia de residuos de cisteína y péptidos ricos con ciertos aminoácidos tal como prolina y glicina (25).

Mecanismos de acción de los péptidos antibacterianos del veneno de escorpión

Usualmente los péptidos son dirigidos a moléculas intracelulares y membranas bacterianas de varias vías de señalización (26–28) y para estas razones ha sido propuesto que su uso haría más difícil para la bacteria llegar a ser resistente al tratamiento. Hay tres diferentes propuestas moleculares de mecanismos de acción para estos péptidos: el modelo alfombra, modelo barril, modelo anular (24,29). Esencialmente estos modelos sugieren que la membrana de la bacteria llegaría a ser permeable o agujereada, condiciones incompatibles con vida. Sin embargo algunos resultados experimentales también han mostrado que otros mecanismos de acción podrían estar presentes, tal como: inhibición de ciertas actividades enzimáticas, inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, alteración de la síntesis de pared celular, inhibición de síntesis de proteínas y unión ácidos nucleicos (27, 28).

1. Mecanismo de barril

Luego de relacionarse con la membrana y lograr un nivel crítico entre péptido y lípido, los péptidos se reorientan de manera perpendicular creando una empalizada con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares, y afrontan el centro originando un poro hidrofílico. La formación de este tipo de poros no es regular en tamaño y duración, lo que origina, al final, una carencia del equilibrio osmótico y del potencial de membrana (24).

2. Modelo del poro toroidal

Los AMPs con alfa hélices adheridos a la membrana, se suman e instigan a la monocapa de lípidos a plegarse sobre sí misma de manera continua, equilibrando la formación del poro por las interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares del péptido que rodean a las cabezas de los lípidos de la membrana, logrando interactuar simultáneamente con las cadenas acilares de los lípidos. Esto forma un poro con los grupos hidrofílicos orientados hacia el centro del poro, atrapando agua en el corazón del mismo (30).

3. Mecanismo forma anular

En este mecanismo, los péptidos se agrupan a la membrana celular al lograr una concentración límite que produce que los lípidos se doblen creando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos que, a

diferencia del anterior, forma un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana.

4. Mecanismo de alfombra

En este mecanismo, los péptidos no se introducen en la membrana, sino que permanecen unidos a la superficie externa, formando una especie de alfombra al llegar a un punto crítico, que puede debilitar la membrana y colapsar en una configuración de micelio; finalmente, la muerte celular ocurre debido a la pérdida de citoplasma (31). Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como latarcín Ltc2a, derivado del veneno de la araña *Lachesana tarabaevi*.

En esencia, estos modelos recomiendan que la membrana de la bacteria se volvería permeable o perforada, condiciones que son anadaltables con la vida. Sin embargo, algunos efectos experimentales también han comprobado que pueden estar presentes otros modos de acción, tal como: inhibición de ciertas actividades enzimáticas, inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, alteración de la síntesis de pared celular, inhibición de síntesis de proteínas y unión ácidos nucleicos (27,28).

Características bioquímicas de los Péptidos Antimicrobianos del veneno de escorpión

Los péptidos antimicrobianos (AMP) representan un mecanismo de defensa antiguo que a través del espectro evolutivo y aún sigue siendo una estrategia eficaz contra la invasión de patógenos. Debido a su selectividad para las membranas procariotas y sus mecanismos de daño de la membrana para los que los microbios tienen poca resistencia natural, el centro de atención en los últimos años se ha orientado hacia el desarrollo de nuevos antibióticos a partir de estos péptidos (25).

El Veneno de escorpión ha demostrado ser una fuente rica de moléculas bioactivas, especialmente los bloqueadores de canales iónicos; en los últimos años se ha reconocido cada vez más que venenos de escorpión también tienen un abundante suministro de péptidos antimicrobianos (24) y se ha sugerido, que la presencia de péptidos antimicrobianos (AMP) podría proteger a la glándula del veneno de la infección y facilitar la acción de las toxinas.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) del veneno de escorpión son péptidos cargados

positivamente anfipáticos y pueden estar convenientemente divididos en tres categorías estructurales: (1) péptidos que contiene cisteína con puentes disulfuro; (2) péptidos con una α -hélice anfipática pero que carecen de residuos de cisteína (3) péptidos ricos en ciertos aminoácidos tales como prolina y glicina

- **Péptidos Antimicrobianos que contiene cisteína**

Los péptidos que contienen cisteína son ubicuos en venenos de escorpión y generalmente contienen 3 ó 4 puentes disulfuro. Estos péptidos se han caracterizado por la interacción con los canales iónicos, es decir de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y canales de Cl^- y conforman la mayor familia de péptidos con respecto a los péptidos sin puente disulfuro que son una familia más pequeña.

El péptido antimicrobiano conteniendo cisteína denominado escorpina fue aislado por Possani y sus colegas (32), del veneno del escorpión Africano *Pandinus imperator*. Escorpina de 8,3 kDa, 75 residuos y 3 puentes disulfuro tiene una estructura única, con similitud N-terminal para algunos cecropinas de insectos y similitud C-terminal a algunos defensinas de escorpiones. Escorpina ha demostrado su actividad a diferentes concentraciones (CMI: 1-10 mM) frente a bacterias Gram positiva (*B. subtilis*) y Gram negativa (*K. pneumoniae*) en ensayos de difusión en agar.

Seis péptidos han sido aislados a partir del veneno de *Tityus discrepans* llamados bactridinas (Bacts) (32), que a diferencia de la familia escorpina contienen 4 puentes disulfuro. Bacts 1 y 2 han sido caracterizados mediante degradación de Edman y análisis in silico revelando péptidos cargados que contienen 61 y 64 residuos. Bacts 1 ha mostrado actividad antimicrobiana un rango de CMI de 22 a 77 mM mientras Bacts 2 en un rango de CMI de 27 a 65 mM. En ensayos hemolíticos, Bacts 1 mostraron sólo el 0,2% en 90 mM y 1,1% a 180 mM y con Bacts 2 mostró 7,6% y 21% a las mismas concentraciones, respectivamente.

- **Péptidos Antimicrobianos sin residuos de Cisteína**

En la actualidad existen péptidos antimicrobianos originales aislados de venenos de escorpión sin residuos de cisteína, sin embargo, son péptidos sin puente disulfuro (298-36) y se encuentran ahora en la mayoría de venenos de escorpiones. Estos péptidos se han dividido en tres grupos, péptidos de cadena larga (>35 aminoácidos), péptidos de cadena intermedia (20-35 aminoácidos) y péptidos de cadena corta (<20 aminoácidos).

- **Péptidos de cadena larga**

Parabutoporina, aislada del veneno del escorpión Sudafricano *Parabuidethus schlechteri* es un péptido altamente básico de 45 aminoácidos, carga total de +7. Una molécula estructuralmente similar, básica con carga +4), existiendo como dos isoformas, opistorporina 1 y 2 fueron aisladas de otro escorpión Sudafricano *Opistophthalmus carinatus*⁷. Estas dos isoformas (44 aminoácidos) difieren en la posición 34, donde una fenilalanina reemplaza una leucina. Parabutoporina fue predicha por tener una estructura α -helicoidal entre los aminoácidos 3-35 en comparación con opistorporina 1 y 2 con dos regiones α -helicoidales entre los residuos 3-14 y 20-39, que están conectados por un corto cola al azar de WNSEP (37).

Hadrurina es el prototipo de otra familia péptidos antimicrobianos libres de cisteína (37), purificada a partir del veneno del escorpión mexicano *Hadrurus aztecus*. Hadrurina tiene una masa 4.436 Da, con 41 aminoácidos, lleva una carga positiva global a pH fisiológico y tiene el mismo perfil estructural como opistorporina, a saber, dos regiones α -helicoidales conectados por una región no definida entre los residuos de aminoácidos 12-16. En los estudios de actividad antimicrobiana con microorganismos Gram-negativos, varias cepas de *E. coli* fueron muy sensibles con CMI menos de 10 mM; en comparación, las cepas de *Pseudomonas* que requieren 50 mM para la inhibición completa.

Otros estudios ejecutados con péptidos antimicrobianos aislados del escorpión *Pandinus imperator* han arrojado a luz la contribución de dos regiones α – hélices discutidas por su función biológica, Pandinina 1 tiene de 3 – 18 y 20 – 39 residuos en contraste; para el péptido Pandinina 2, éste tiene una estructura singular hélice

entre los residuos 2 – 18. Mientras que su actividad antimicrobiana de estos dos péptidos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas es similar (39).

Otro péptido de cadena larga, vejovina con peso molecular 4,8 kDa y 47 aminoácidos, fue aislado a partir del veneno de *Vaejovis mexicanus* (24), con 52% de homología con hadrurina. En los ensayos antimicrobianos realizados en cultivo líquido, tanto vejovina nativo y sintético mostraron actividad preferencial hacia los microorganismos Gram negativas como *E. coli* la que fue inhibida con una Concentración Mínima Inhibitoria de 4.4 - 20 mM, sin embargo dicho péptido no tuvo actividad frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*.

- **Péptido de cadena intermedia**

Una clase completamente nueva de péptidos con propiedades antimicrobianas obtenidos de la glándula del veneno del escorpión asiático *Heterometrus spinifer* (44), se ha reportado de genes que codifican cuatro péptidos altamente homólogos que fueron caracterizados y un péptido (HsAp) se sintetizó mediante métodos de estado sólido.

HsAp (29 aminoácidos) no mostró homología significativa con cualquier otra clase de péptidos antimicrobianos de escorpión. Tiene amplio espectro de actividad antibacteriana frente ambos tipo de bacterias Gram-positivas (CMI típicamente 11-50 mM) y Gram-negativos (CMI de 25-50 mM), sin especificidad de células objetivo claro, así como la actividad antifúngica (CMI aprox. 50 mM). HsAp fue postulado por tener una estructura α -helicoidal (residuos 7-24) con colas terminales de N y C. Tiene características anfipáticas clásicos aunque su cara hidrofóbica es interrumpida por dos residuos hidrófilos (Ser y Glu).

- **Péptidos de cadena corta**

Los primeros péptidos antimicrobianos de cadena corta fueron aislados a partir del veneno de escorpión africano *Opisthacanthus madagascariensis*. IsCT y IsCT2 (41), comparten el 78% de homología (ambos aprox. 1,5 kDa, 13 aminoácidos), tienen la misma carga neta (+2) y son tanto amidados en el C-terminal. El precursor de cada péptido consiste en un péptido señal y una pro-secuencia C-terminal que contiene las señales de procesamiento C-terminal típicos Gly-Arg-Gly-Arg o Lys-Arg. Ambos péptidos muestran un perfil de amplio espectro contra bacterias Gram positivos que contra Gram negativos en placas de agar sólido (CMI típicamente 0,6 a 16 mM), aunque en cepas Gram

negativos de *Pseudomonas* eran inusualmente resistentes (CMI normalmente > 66 mm). Ambos péptidos son débilmente hemolíticos, 10% de lisis de eritrocitos de oveja a 100 mM (41).

1.4. Formulación del Problema.

¿Cuál es la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.5. Justificación e importancia del estudio.

El presente trabajo de investigación se justifica en los estudios que reportan de la prevalencia de caries y del empleo de diferentes alternativas terapéuticas para su control, inclusive se ve influenciado con la presencia de *Streptococcus mutans* como responsable del origen de las caries.

En relación a los venenos de escorpión, otros estudios han permitido obtener diferentes de principios bioactivos como péptidos con capacidad inhibitoria sobre diferentes bacterias, aun así no siempre los resultados de las investigaciones son coincidentes, lo que sugiere que existe una relación entre el efecto del veneno y las especies de escorpiones. En nuestro medio, existen escasos reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio del veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* procedente de la región Lambayeque sobre *Streptococcus mutans*.

Esta situación motiva a la ejecución del presente estudio cuyos resultados permitirán determinar si el veneno de *H. charcasus*, tiene efecto antibacteriano, teniendo con ello la capacidad de motivar otros estudios destinados a, demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos tipo parásitos u hongos, la purificación de los principios bioactivos presentes en el veneno, a su uso en terapia o como desinfectante.

1.6. Hipótesis.

El veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

1.7. Objetivos.

1.7.1. Objetivo general

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruides charcasus* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

-

1.7.1. Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruides charcasus* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Tipo y Diseño de Investigación.

Para el presente proyecto de investigación se empleó el tipo de investigación cuantitativa, con diseño de tipo experimental de estímulo creciente (37).

2.2 Población y muestra.

Para el presente trabajo se obtuvo una muestra no probabilística, fue de 3, constituidos por 3 concentraciones del veneno, 1 cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y, se realizaron 5 repeticiones, por lo tanto, se obtuvo 15 unidades experimentales.

- Representación del cálculo de la muestra:

M: Concentraciones x Tipo de extracto x cepa bacteriana

$$M: 3 \times 1 \times 1 = 3$$

- Representación del cálculo de las unidades experimentales:

UE: muestra x n° repeticiones

$$UE: 3 \times 5 = 15$$

2.3 Variables, Operacionalización.

Variable Independiente: Veneno de escorpión *Hadruides charcasus*

Variable Dependiente: Actividad antibacteriana

Variables	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Variable Independiente: Veneno de escorpión <i>Hadruides charcasus</i>	Concentraciones del veneno	Concentraciones 100%, 50%, 25%	Dilución doble seriada
Variable Dependiente: Actividad antibacteriana	Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Botón de crecimiento de ≤ 2 mm	Microdilución Caldo Mueller Hinton

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

2.4.1 Técnicas

Obtención del veneno:

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica (39) a 22 voltios en el último segmento postabdominal (telson) y la muestra de veneno fue colectada en tubos eppendorf (2 mL), diluida con agua desionizada, se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos, el pellet fue solubilizado durante 5 veces, las fracciones solubles fueron recolectados en tubo Falcon estéril y almacenado a -20 °C.

Preparación del agente antibacteriano

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (40), para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$, mg/mL , (p/p).

- El veneno fue recolectado con agua desionizada, se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos.
- Las fracciones solubles del veneno se usaron para realizar las diluciones dobles seriadas y calcular las concentraciones expresadas en porcentajes (Anexo n° 1).

Actividad Antibacteriana

Preparación del inóculo

Según las orientaciones de la Clinical and Laboratory Standards Institute (45).

a. Colonias para el inóculo

Las colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar Cerebro Corazón después de 18 a 24 horas.

b. Preparación de la suspensión del inóculo (Anexo 2).

- De la placa de agar, se seleccionó de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se tocó con un asa y se transfirió a un tubo con 4-5 mL de caldo Müller-Hinton.
- Con ayuda del espectrofotómetro se midió turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland, con absorbancias de 0,08 – 0,1 para bacterias a una longitud de onda de 625 nm (46).

La suspensión bacteriana resultante contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ (UFC/mL).

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez del inóculo al 0,5 del estándar de McFarland, se añadió 0,5 mL de la suspensión a 9,5 mL de agua

grado destilada (dilución 1:20) para alcanzar la concentración final de 5×10^6 (UFC/mL).

c. Control de pureza del inóculo

Se tomó un asa llena con la suspensión del pocillo con el cultivo control de crecimiento o del reservorio del inóculo, y se procedió a realizar un subcultivo en una placa de agar Müller-Hinton. Se Incubó durante la noche a 37°C para comprobar que no haya contaminación antes de proceder con la lectura de la placa de CMI.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

- La CMI es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento del microorganismo en los pocillos de microdilución detectado a simple vista.
- El crecimiento del control positivo se determinó por un botón de crecimiento de ≤ 2 mm o una turbidez definida.

Procedimiento:

- La prueba de microdilución de la CMI en caldo Müller-Hinton se realizó en una placa de poli-estireno que posee 96 pocillos. Un pocillo sirvió como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirvió como control negativo (sólo caldo).
- Del inóculo, con una micropipeta se repartieron 0,05 mL en cada pocillo (5×10^4 UFC/mL). de una microplaca.
Se repartieron 50 μL de cada dilución del veneno en cada pocillo de la microplaca.
- Se incubó las bandejas de microdilución a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16 a 20 horas en una incubadora. Para mantener la misma temperatura de incubación, no se apiló más de cuatro bandejas de microdilución.
- Para prevenir el secado, se utilizó una tapa de plástico bien ajustada para la incubación.

2.4.2 Instrumento de recolección de datos

Se empleó una ficha de recolección de datos, con la finalidad de determinar la actividad antibacteriana del veneno de escorpión a diferentes concentraciones, midiendo los botones crecimiento bacteriano.

2.5 Métodos de análisis de datos.

Para determinar la relación del efecto antibacteriano del veneno de escorpión en el crecimiento bacteriano, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para un solo factor $5 \times 1 \times 1 \times 3$ (cinco repeticiones, una especie, 1 tipos de veneno y 3 concentraciones). Asimismo, se empleó una prueba estadística descriptiva para determinar promedios y desviación estándar de los tamaños de los botones de crecimiento.

2.6 Aspectos éticos.

Para la obtención del veneno, se empleó la estimulación eléctrica con un voltaje tolerable para el escorpión y, con la finalidad de no sacrificar el espécimen y no atentar con la disminución de su especie.

Se consideró aspectos de bioseguridad, con respecto a su inactivación de los medios con *Streptococcus mutans*, mediante autoclavado, con la finalidad de evitar su propagación.

2.7 Criterios de rigor científico

Confiabilidad

Para la medición de los halos inhibición de crecimiento bacteriano, para la medición de los botones se empleó el software LAS EZ LEICA 3.0.0.

Validez

Para el presente estudio se tomó en cuenta la ficha de recolección de datos en relación a número de repetición, con la finalidad de tener una consistencia interna del efecto antibacteriano del veneno de escorpión.

III. RESULTADOS

Tabla 1.

Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del veneno de escorpión Hadruides charcasus contra Streptococcus mutans ATCC 25175

Pocillos (mm)	Control Positiva	Concentraciones			P
		100 %	50 %	25 %	
\bar{X}	2.18	0,9	1,09	1,5	0,000
SD	0	0,08	0,18	0,14	

Fuente: Datos proporcionados por la investigadora

En la Tabla 1: Para la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión *Hadruides charcasus*, se obtuvieron promedios (\bar{X}) de las mediciones en milímetros de los botones de crecimiento bacteriano de 0,9 mm al 100 %, 1,09 mm al 50% y de 1,5 mm al 25%, así como su desviación estándar (SD). Para la actividad antibacteriana se realizó una prueba análisis de varianza de un solo factor, se obtuvo un valor de P menor que el nivel de significancia ($P < 0,05$).

Tabla 2.

Determinación la concentración mínima inhibitoria de la actividad antibacteriana in vitro del veneno de escorpión Hadruides charcasus contra Streptococcus mutans ATCC 25175

Pocillos (mm)	Control Positiva	Control negativo	Concentraciones		
			100 %	50 %	25 %
A	2,18	0	0,956	1,39	1,59
B	2,18	0	0,917	1,06	1,6
C	2,18	0	0,917	0,956	1,59
D	2,18	0	0,76	0,956	1,44
E	2,18	0	0,969	1,12	1,28

Fuente: Datos proporcionados por la investigadora

En la tabla 2: Para las concentraciones evaluadas no presentaron CMI, pero los botones de crecimiento bacteriano fueron menor a 2mm, por tanto, todas las concentraciones evaluadas presentaron una capacidad inhibitoria parcial pero no total.

Análisis de varianza

Tabla 3.

Análisis de varianza de un solo factor para el veneno de escorpión *Hadruido charcasus*.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	0.925736933	2	0.46286847	23.7662984	0,000
Dentro de los grupos	0.23371	12	0.01947583		
Total	1.159446933	14			

Ho: El veneno de escorpión no tienen actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Ha: El veneno de escorpión tienen actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Regla de decisión

Si el valor de $P < 0,05$ Rechaza la Ho

Si el valor de $P > 0,05$ Acepta la Ho

Se realizó un análisis de varianza de un solo factor para la actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de escorpión de las 3 concentraciones, se obtuvo un valor de P menor que el nivel de significancia ($P < 0,05$). Por lo tanto se rechaza la Ho.

IV. DISCUSIÓN

La prevalencia de Caries temprana se ha registrado desde los 2 años de edad y con una placa visible (47). Además, las características distributivas del modelo se aproximan a los hallazgos de los estudios epidemiológicos que indican que, tanto para la caries como para la periodontitis, existe una relación casi lineal con aumentando la edad (48), asimismo se ha revelado que *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son los principales agentes etiológicos de la caries dental comprobados a través de la secuenciación 16S rDNA (49).

En esta investigación, se encontró que el veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* presentó actividad antibacteriana a las concentraciones del 100 %, 50 % y 25 %, además *S. mutans* ATCC 25175 fue sensible a las concentraciones evaluadas en concordancia según las orientaciones del CLSI (45).

Para el caso del veneno, existen hallazgos que revelan el poder antibacteriano del veneno de escorpiones de otras especies frente a bacterias gram positivas como gram negativas, inclusive aislando los principios bioactivos caracterizados como péptidos catiónicos, esto corrobora la actividad antibacteriana del veneno de *Hadruidoidea charcasus* (6-8,14-16).

A través de los resultados de la presente investigación, sugiere que el veneno de *Hadruidoidea charcasus* presenta proteínas de bajo peso molecular, el cual se demostró por su capacidad de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, considerándose un resultado preliminar, por tanto este hallazgo es coincidente con el veneno de *Pandinus imperator* por poseer actividad relativamente fuertes frente a bacterias gram positivas que gram negativas (7), también se encontró en el veneno de escorpión de la especie *Heterometrus petersii* teniendo un péptido con capacidad inhibitoria frente a gram positivas incluyendo a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (8).

Por otro lado, se encontró que el veneno del escorpión *Veajovis punctatus* poseen cuatro péptidos con capacidad inhibir eficazmente a bacterias gram positivas incluyendo a *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* a diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (14), como también en los venenos de *Scorpiops tibetanus* y *Tityus serrulatus* revelaron

su capacidad antibacteriana frente a bacterias gram positivas inclusive la presencia de péptidos de muy bajo peso molecular (15,16).

Con este estudio se concluye que las toxinas presentes en el veneno de *Hadruidoidea charcasus* pueden inhibir el crecimiento de las bacterias, inclusive a través de investigaciones futuras, purificando sus componentes con fines de aplicación a contra otros microorganismos periodontopatogénicos.

A futuro las moléculas del veneno del escorpión podrán actuar como un medicamento antibiótico para potenciar su efecto, con dosis más bajas que dañen menos a los pacientes.

En concentraciones bajas puede tener un efecto potenciador con antibióticos comunes. Cuando se unen los dos (antibiótico y molécula), tiene la capacidad de formar poros en la célula; así, el antibiótico puede penetrar más al organismo.

Además, ante dosis altas muchas bacterias han generado resistencia, “pero si tenemos una molécula que reduzca la alta concentración, será mucho mejor para la persona. Los antibióticos tienen menos daños colaterales y se reduce el tiempo de infección muy rápido al contar con medicamentos muy dirigidos”.

V. CONCLUSIONES

Se concluye que:

- El veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* presentó actividad antibacteriana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- El veneno de escorpión *Hadruidoidea charcasus* no presentó concentración mínima inhibitoria a las concentraciones de 100%, 50%, 25% contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

VI. RECOMENDACIONES

Se sugiere:

- Emplear un método para determinar la concentración de proteínas presentes en el veneno.
- Evaluar con cepas clínicas de *Streptococcus mtans*, con la finalidad de evaluar su potencial actividad antibacteriana.
- Aislar los componentes bioactivos presentes en el veneno de escorpión, con la finalidad de evaluar características bioquímicas y microbiológicas.
- Se sugiere hacer más estudios necesarios sobre la toxicidad de las diferentes fracciones proteicas en el veneno del escorpión *Hadruidoies charcasus* con la finalidad de evaluar las concentraciones en el uso de la cavidad oral.

VII.REFERENCIAS

1. Limbu S, Dikshit P, Bhagat T. Significant Caries Index Evaluation of Dental Caries Among Preschool Children in Kathmandu. J Nepal Med Assoc. 2017; 56(207): 341-5.
2. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis a comprehensive review. J Clin Periodontol 2017; 44 (Suppl. 18): S94–S105
3. Amit A, Narendar M, and James RJ. Factors Associated with Dental Caries in Primary Dentition in a Non-Fluoridated Rural Community of New South Wales, Australia. Int. J. Environ. Res. Public Health 2017, 14, 1444.
4. Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, Su L, Ptacek T, Eipers P, Morrow C, Lefkowitz EJ, Melander C, Wu H. Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. Journal of Dental Research. 2017; 1-8
5. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. Expert Rev Proteomics 2012; 9: 311–323.
6. Nie Y, Zeng XC, Yang Y, Luo F, Luo X, Wu S, Zhang L, Zhou J. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. Peptides. 20120; 38: 389 – 394
7. Zeng CX, Zhou L, Shi W, Luo X, Lei Zhanga, Yao Niewa, Wang J, Wu S, Cao B, Cao H. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator* Peptides. 2013; 45: 28 – 34
8. Li Z, Xu X, Meng L, Zhang Q, Cao L, Li W, Wu Y, Cao Z. Hp1404, a New Antimicrobial Peptide from the Scorpion *Heterometrus petersii*. PLOS ONE. 2014; 9(5): e97539
9. OMS| Salud bucodental [Internet]. 2012 [Citado 30 de enero del 2018] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
10. Nogami Y, Iwase Y, Kagoshima A, Saitoh I, Nakajima T, Takahashi H, et al. Dental caries prevalence and treatment level of neglected children at two child guidance centers. pediatric dental journal xxx. 2017; 1 - 5

11. Maran S, Shashikiran ND, Ahirwar P, Maran P, Kannojiya PR, Niranjana B. Prevalence of Dental Caries and Traumatic Dental Injuries among 6- to 12-year-old Children in Bhopal City, India. *Int J Clin Pediatr Dent* 2017;10(2):172-176.
12. Gotouda H, Shinozaki-Kuwahara N, Taguchi C, Shimosaka M, Ohta M, *et al.* Evaluation of the Proportion of Cariogenic Bacteria Associated with Dental Caries. *Epidemiology (Sunnyvale)* 2017; 7: 327.
13. Esberg A, Sheng N, Mårell L, Claesson R, Persson K, Borén T, Strömberg N. *Streptococcus mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine*. 2017; 24: 205–215
14. Ramírez-Carreto S, Jiménez-Vargas JM, Rivas-Santiago B, Corzo G, Possani LD, Becerril B, Ortiz E. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. *Peptides*.2015; 73: 51–59
15. Cao L, Li Z, Zhang R, Wu Y, Li W, Cao Z. StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides*. 2012; 36: 213–220
16. Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, Chen T, Shaw C. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*. 2013; 95: 1784 -1794
17. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2016; 6(53): 1 – 7
18. Pitts NB. Score system for monitoring the behavior of radiologically diagnosed approximal carious lesions. *Community Dent Oral Epidemiol* 1985;13:268–72.
19. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* and dental caries *Rev. CES Odont*. 2013; 26(1): 44-56
20. Nakano K, Ooshima T. 2009 Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol* 4:891–902. [PubMed: 19722842]
21. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. 2002 Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14434–14439. [PubMed: 12397186]
22. Bowen WH, Koo H. 2011 Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45:69–86.

23. Zeng L, Burne RA. 2013 Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *J Bacteriol* 195:833–843. [PubMed: 23222725]
24. Hernández CA, Silva J, Quintero V, Rodríguez A, Balderas C, Possani LD, Gurrola GB. Vejovine a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon*. 2011; 57: 84–92
25. Harrison PL, Abdel MA, Miller K, Strong PN. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, 2014; 88, 115 – 137
26. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3: 238–250.
27. Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *Bio Drugs*. 2003; 17: 233–240.
28. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Journal*. 2006; 19: 491–511.
29. Giuliani A, Pirri G, Bozzi A, Di Giulio A, Aschi M, Rinaldi AC. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane active compounds. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008; 65: 2450–2460.
30. Castañeda J, Ortega JA, Venegas AM, Aquino A, Serafín J, Estrada S, Estrada I. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. 2009; 18(1): 16-29
31. Téllez GA, Castaño J, Castaño C. Péptidos antimicrobianos Grupo de inmunología molecular, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. *Infectio*. 2010; 14(1): 55-67
32. Conde R, Zamudio M, Rodríguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion. *FEBS Letters*. 2000; 471: 165-168.
33. Diaz P, D'Suze G, Salazar V, Sevcik C, Shannon JD, Sherman NE, Fox JW. Antibacterial of six novel peptides from *Tytus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. 2009; 54: 802- 817.
34. Kuhn L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci*, 2003; 60: 2651-2668.
35. Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*. 2004; 25: 143–150.

36. Gao B, Xu J, Del Carmen M, Lanz H, Hernandez R, Du W, Zhu S. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie*. 2010; 92: 350 - 359.
37. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, Thevissen K, Tytgat J, Van Eldere J, Van Der Walt J, Verdonck F. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269: 4799–4810.
38. Torres A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani DL. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem*. 2000; 267: 5023-5031
39. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, Weilan HE, Norton RS, Nakajima T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. Journal*, 2000; 359: 35–45.
40. Nie Y, Chun X, Yang Y, Luo F, Luo X, Wu S, Zhang L, Zhou J. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*. 2012; 38: 389 – 394
41. Dai L, Corzo G, Naoki H, Andriantsiferana M, Nakajima T. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 293: 1514–1522.
42. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edición. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689 p.
43. Valgas C, Machado S, Smânia EFA, Smânia AJr. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38: 369-380
44. Zavaleta A. El veneno del escorpión: Bioquímica y Farmacología, *Boletín de Lima*. 1983; 30, 75-88
45. Clinical and Laboratory Standards Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
46. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6: 71 – 79
47. Manji F, Dahlen G, Fejerskov O. Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on Their Aetiology. *Caries Res*. 2018; 52(6) 548 - 564

48. Un Lam C, Khin LW, Kalhan AC, Yee R, Lee YS, Chong MFF, Kwek K, Saw SM, Godfrey K, Chong YS, Hsu CY. Identification of Caries Risk Determinants in Toddlers: Results of the GUSTO Birth Cohort Study. *Caries Res.* 2017; 51: 271 - 282
49. Salman HA, Senthikumar R, Imran K, Selvam KP. Isolation and Typing of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* from Caries-active Subjects. *Comtemp Clin Dent.* 2017; 8(4): 587 - 593

ANEXOS

Anexo N° 1

ESQUEMA DE DILUCIÓN DEL VENENO

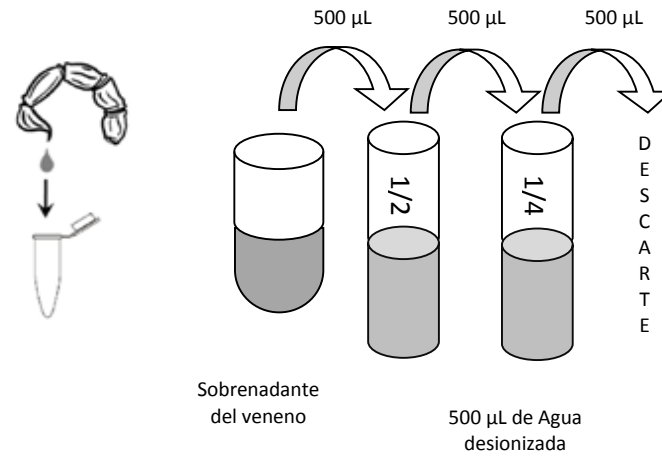


Figura N° 1. Esquema de dilución del veneno de escorpión.

Anexo 2
INÓCULO BACTERIANO

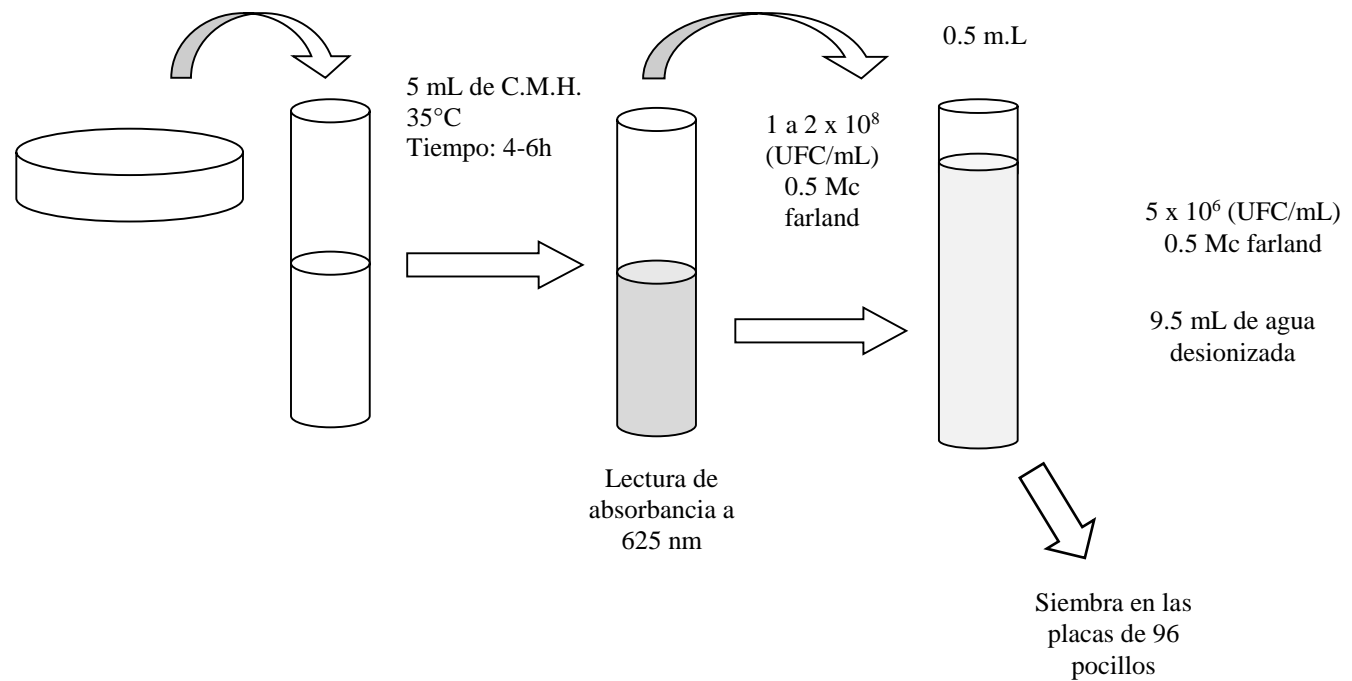


Figura N° 2. Preparación del inóculo bacteriano

Anexo 3

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

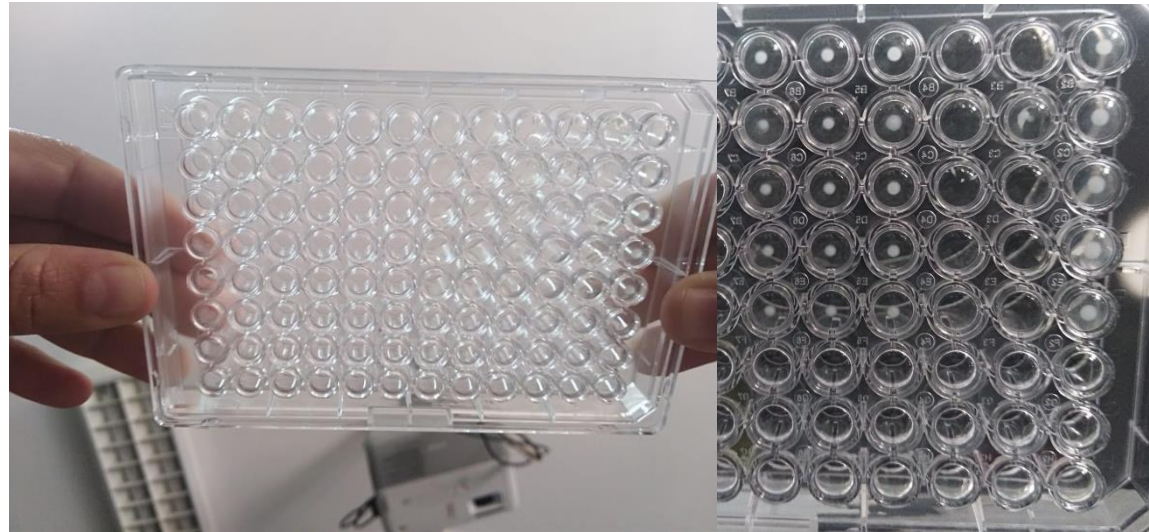


Figura N° 3. Actividad antibacteriana en placa de 96 pocillos