

Selección *in silico* y evaluación *in vitro* de compuestos con potencial inhibitorio de la adhesión dependiente del antígeno I/II de *Streptococcus mutans*

“Tesis de Doctorado presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas”

Presentado por:

Raúl Eduardo Rivera Quiroga *BSc., MSc.*

Facultad: CIENCIAS DE LA SALUD

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Armenia – Quindío

2020

Selección *in silico* y evaluación *in vitro* de compuestos con potencial inhibitorio de la adhesión dependiente del antígeno I/II de *Streptococcus mutans*

TESIS DE GRADO

Para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tutor:

LEONARDO PADILLA SANABRIA PhD.

Co-tutor:

NESTOR IVAN CARDONA PhD.

Comité Tutorial

CARLOS ENRIQUE MUSKUS PhD.

NELSON ENRIQUE ARENAS PhD.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Armenia- Quindío

2020

**DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

			
SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197

Sin la publicación, la ciencia está muerta

Gerard Piel, 1915-2004, ex-editor de *Scientific American*, quien contribuyó a la reinención de la revista y a la redefinición de la era moderna del periodismo científico, citado por Robert A. Day en "How to write and publish a scientific paper", 1998, p. 8.

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

FECHA: Noviembre 12 de 2020

ESTUDIANTE: **RAUL EDUARDO RIVERA QUIROGA**

DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor Leonardo Padilla Sanabria

TITULO DEL TRABAJO:

“Selección *in silico* y evaluación *in vitro* de compuestos con potencial inhibitorio de la adhesión dependiente del antígeno *I/II* de *Streptococcus mutans*”

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____

APROBADO X

MERITORIO _____

LAUREADO _____

Jurado 1:

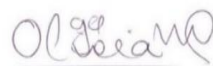
Doctora
MAYRI A. DIAZ DE RIENZO, PhD.
Liverpool Johns Moore University

Jurado 2

Doctor
JORGE WILLIAM VARGAS F, PhD.
Universidad de Antioquia

Jurado 3:

Doctor
AYLAN FARID ARENAS, PhD.
Universidad del Quindío
Armenia



Coordinadora del Doctorado:

Doctora
OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD
Universidad del Quindío
Armenia

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

Dedicatoria

*A mis padres **Elsy Quiroga** y **Raúl Darío Rivera** y mi hermana **Mónica B. Rivera***

*A mi hija **Luciana Rivera Rodríguez***

*A mi novia **María Carolina Parra Leiva***

Agradecimientos

Universidad del Quindío – Doctorado en Ciencias Biomédicas -

Directora del Doctorado Dra. **Olga Alicia Nieto**

Director de tesis Dr. **Leonardo Padilla**

Co-director Dr. **Néstor Iván Cardona**

Comité tutorial – Dr. **Carlos Muskus** (Universidad de Antioquia), Dr. **Nelson Arenas**

(Universidad Antonio Nariño)

Integrantes del Grupo de inmunología molecular (GYMOL) – Dr. **Jhon Carlos Castaño**

Centro de investigaciones Biomédicas (Uniquindio) – **Elizabeth Torres**

Docentes doctorado: Dr. **Jorge Enrique Gómez**, Dra. **Fabiana María Lora**, Dra. **Nelsy Loango**, Dra. **Ingeborg Carvajal**, Dr. **Daniel Meneses**.

Universidad de Antioquia: Dra. **María Cecilia Martínez**, Dra. **Sandra Milena Morales**, Dr. **Wbeimar Rivera**, Dr. **Pedronel Araque**

Liverpool John Moores University – Dra. **Mayri Alessandra Díaz De Rienzo**.

Grupo de Investigación y Asesoría en Estadística - Universidad del Quindío: Dra. **Gladys Elena Salcedo Echeverry**, Dr. **Aylan Farid Arenas**.

Cristian Camilo Rocha y Diana Sofia Puerta

Dr. **Juan Guillermo Sanin** y Dra. **Maria Fernanda Quiroga** y docentes Universidad Antonio Nariño.

Compañeros del doctorado: **Lily J. Toro**, **Diana M. Garcia**, **Johanny Aguillon**, **Julio C. Luna**, **Diego Molina** y **John A. Acosta**.

Asociación Colombiana de Infectología (ACIN)

Compañeros, amigos y familia.

Tabla de contenido

CAPITULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Caries dental.....	3
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de la caries.....	5
1.3 Streptococcus mutans.....	6
1.4 Antígeno I/II de Streptococcus mutans.....	9
1.5 Búsqueda virtual de inhibidores	11
1.6 Acoplamiento “Docking molecular” molecular.....	13
1.7 Simulación de dinámica molecular (MD).....	15
Capitulo II.	17
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
CAPITULO III.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Búsqueda virtual y selección de compuestos	18
3.1.1 Selección de proteínas y análisis de similitud de secuencia:	18
3.1.2 Selección de sitios de unión de ligando.....	21
3.1.3 Acoplamiento “Docking” molecular	22
3.1.4 Selección de compuestos	23
3.1.5 Predicción in silico de propiedades ADME de los compuestos seleccionados.....	24

3.1.6 Predicción computacional de toxicidad de los compuestos	25
3.1.7 Análisis de tipo de interacción compuesto - proteína.....	26
3.2 Evaluación <i>in vitro</i> de los compuestos seleccionados.....	27
3.2.1 Soluciones de trabajo de los compuestos	27
3.2.2 Ensayo de citotoxicidad en células FLP.....	27
3.2.3 Ensayo de actividad antimicrobiana sobre <i>Streptococcus mutans</i> - Lt11 (UB579 WT) y <i>Candida albicans</i> NCPF 3179	28
3.2.4 Ensayo de adhesión en <i>Streptococcus mutans</i> - Lt11 (UB579 WT).....	29
3.3 Análisis de datos	30
3.4 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
3.5 Simulaciones de dinámica molecular	31
CAPITULO IV	33
3 RESULTADOS.....	33
4.1 Selección de proteínas y análisis de similitud de secuencia	33
4.2 Selección de sitios de unión de ligando.....	39
4.3 Acoplamiento molecular y selección de compuestos	40
4.4 Predicción <i>in silico</i> de propiedades ADME de los compuestos seleccionados	42
4.5 Predicción computacional de toxicidad de los compuestos.	43
4.6 Análisis de tipo de interacción compuesto – proteína.....	47
4.7 Ensayo de citotoxicidad y actividad antimicrobiana.....	49
4.8 Ensayo de adhesión en <i>Streptococcus mutans</i> - Lt11 (UB579 WT).....	52

4.9 Simulación de dinámica molecular.....	56
<i>CAPITULO V</i>	58
4 <i>DISCUSIÓN</i>	58
<i>CAPITULO VI</i>	69
5 <i>CONCLUSIONES</i>	69
<i>CAPITULO VII</i>	71
6 <i>RECOMENDACIONES</i>	71
<i>CAPITULO VIII</i>	72
7 <i>ANEXOS</i>	72
<i>CAPITULO IX</i>	90
8 <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	90

Lista de imágenes

FIGURA 1. ANATOMÍA NORMAL DEL DIENTE Y BIOPELÍCULA DENTAL EN DESARROLLO.	5
FIGURA 2. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>S. MUTANS</i> SECRETADOS Y EXPRESADOS EN LA SUPERFICIE DE LA PARED CELULAR.	8
FIGURA 3. ESTRUCTURA LINEAL DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA AGI/II QUE MUESTRA LA LOCALIZACIÓN DE REGIONES FUNCIONALES ESPECÍFICAS.	9
FIGURA 4. MODELO DE LA ESTRUCTURA AG I/II Y UNIÓN PREVISTA CON SAG.	10
FIGURA 5. ESTRUCTURAS DE LOS CRISTALES DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS AL AG I/II DE <i>S. MUTANS</i>	34
FIGURA 6. DATOS DE COORDENADAS Y ESQUEMA DE UBICACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN.	40
FIGURA 7. DATOS DE LD50 (MG / KG) CALCULADOS PARA COMPUESTOS SELECCIONADOS.	44
FIGURA 8. DATOS DE PROBABILIDAD PREDICTIVA DE TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS.	46
FIGURA 9. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS POR ANÁLISIS IN SILICO.	46
FIGURA 10. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD SOBRE CÉLULAS DE FLP.	50
FIGURA 11. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE <i>S. MUTANS</i> – LT11.	51
FIGURA 12. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE <i>C. ALBICANS</i> - NCPF 3179.	52
FIGURA 13. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ADHESIÓN DE <i>S. MUTANS</i> – LT11.	54
FIGURA 14. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE AGLUTINACIÓN DE <i>S. MUTANS</i> - LT11 TRATADA CON LOS COMPUESTOS.	55
FIGURA 15. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA ADHESIÓN DE <i>S. MUTANS</i> – LT11.	56
FIGURA 16. GRAFICAS DE LA SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO 3IPK/ZI-187.	57
FIGURA 17. CRISTALES DE LAS REGIONES DE LA PROTEÍNA AG I/II DE <i>S. MUTANS</i>	59
FIGURA 18. ESTRATEGIA COMPUTACIONAL PROPUESTA PARA LA BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE COMPUESTOS:	69

Lista de tablas

TABLA 1. DATOS DE BÚSQUEDA DE ESTRUCTURA DEL AG I/II DE <i>S. MUTANS</i>	34
TABLA 2. DATOS HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS HUMANAS.	35
TABLA 3. DATOS BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS PROCARIOTAS.	36
TABLA 4. DATOS BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS BACTERIAS DE CAVIDAD ORAL.	38
TABLA 5. DATOS BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL.	39
TABLA 6. DATOS DE RE-ACOPAMIENTO LOCAL DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS.	41
TABLA 7. DATOS DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y FARMACOCINÉTICOS PREDICTIVOS.	42
TABLA 8. DATOS DE INTERACCIONES DE TIPO PUENTES DE HIDRÓGENOS.	48
TABLA 9. DATOS DE CÁLCULO DE SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS.	49
TABLA 10. DATOS IC ₅₀ DE LOS COMPUESTOS EN INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE <i>S. MUTANS</i> – LT11.	55

Lista de anexos

ANEXOS 1: SECUENCIA DE COMANDOS O "SCRIPT" EJECUTADA EN EL PAQUETE R-STUDIO.	72
ANEXOS 2: RESULTADOS DE LOS ALINEAMIENTOS SE SECUENCIA PARA LAS PROTEÍNAS 3IPK Y 3QE5.	73
ANEXOS 3: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ZI-187, ZI-939, ZI-906 Y LA CLORHEXIDINA OBTENIDOS CON EL PROGRAMA EN LINEA PROTOX-II	81
ANEXOS 4: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS REALIZADAS A LOS DATOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ZI-187, ZI-939 Y ZI-906 A CONCENTRACIONES DE 1000 -100 -10 μ M, SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>S. MUTANS</i> – LT11, TRATADAS POR 24 HORAS.	85
ANEXOS 5: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS REALIZADAS A LOS DATOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ZI-187, ZI-939 Y ZI-906 A CONCENTRACIONES DE 1000 -100 -10 μ M, SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>C. ALBICANS</i> - NCPF 3179, TRATADAS POR 24 HORAS.	86
ANEXOS 6: CERTIFICADO DE PONENCIA ORAL EN EVENTO INTERNACIONAL	87
ANEXOS 7: CERTIFICADOS DE PARTICIPACIÓN EN EVENTOS NACIONALES	88
ANEXOS 8: CERTIFICADO DE ACEPTACIÓN DE ARTICULO PARA PUBLICACIÓN.	89

RESUMEN:

El antígeno I/II (Ag I/II) es una adhesina de *Streptococcus mutans* involucrada en el proceso de adhesión al diente y co-agregación bacteriana para la formación de biopelículas y producción de la caries dental. El objetivo de esta investigación fue identificar compuestos con potencial inhibitorio de adhesión de *S. mutans* a través del antígeno I/II. Para ello, se realizó una búsqueda virtual de 883.551 compuestos, utilizando las cristalizaciones de proteínas (PDB-ID: 3IPK) y (PDB-ID 3QE5) del Ag I/II disponibles. Se diseñó un protocolo de búsqueda y selección de los compuestos basado en la energía de acoplamiento molecular, número de sitios de interacción, propiedades ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) y características tóxicas. Se realizaron ensayos *in vitro* de citotoxicidad en células de fibroblasto periodontal (FLP), de actividad antimicrobiana en *S. mutans* (LT-11) y *C. albicans* (NCPF 3179) y de adhesión en microplacas de poliestireno con *S. mutans*, análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) y simulación de dinámica molecular. Los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 obtenidos, no presentaron citotoxicidad sobre células FLP, ni efectos sobre el crecimiento de *S. mutans* y *C. albicans* (P-valor < 0,001) e inhibieron la adhesión de *S. mutans* en 95,0% a 100 μ M con un IC50 de 30,7 μ M (ZI-187), 83,1% a 100 μ M con un IC50 de 12,6 μ M (ZI-939) y 81,7% a 100 μ M con un IC50 de 78,6 μ M (ZI-906). Mediante la microscopía electrónica se evidenció que el compuesto ZI-187 no generó cambios en la morfología de *S. mutans*. La simulación de dinámica molecular de 300 nanosegundos, comprobó la estabilidad de la interacción entre ZI-187 y 3IPK. Se obtuvieron 3 compuestos sin actividad citotóxica ni actividad antimicrobiana, con capacidad de inhibir la adhesión de *S. mutans* y se estableció un protocolo para la búsqueda y selección virtual de compuestos basado en estructuras que puedan aplicarse para otros patógenos.

ABSTRACT:

Dental caries is the most prevalent human non-communicable disease, being the *Streptococcus mutans* the most associated microorganism, due to its ability to form biofilms. Antigen I/II is a *S. mutans* adhesin of involved in the adhesion process to the tooth and bacterial co-aggregation in the biofilm formation. The aim of this research was to identify compounds with adhesion inhibitory potential of Ag I/II *S. mutans*. A virtual screening from 883,551 compounds was carried out, using the available crystal structures for PDB-ID: 3IPK and PDB-ID 3QE5 proteins of Ag I/II, a search and selection compound pipelines were designed based on molecular docking energy, number of interaction sites, Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) properties, and toxic characteristics. *In vitro* assays were carried out for cytotoxicity in periodontal fibroblast cells (FLP), antimicrobial activity in *S. mutans* LT-11 and *C. albicans* (NCPF 3179); *S. mutans* adhesion in polystyrene microplates, analysis of scanning electron microscopy and simulation of molecular dynamics. Compounds ZI-187, ZI-939 and ZI-906 did not have cytotoxicity on the FLP cells growth, *S. mutans* or *C. albicans* (P-value <0.001), they inhibited the adhesion of *S. mutans* LT-11 on 95% at 100 μ M with an IC₅₀: 30.7 μ M (ZI-187), 83.1% at 100 μ M with an IC₅₀: 12.6 μ M (ZI-939) and 81.7% at 100 μ M with IC₅₀: 78,6 μ M (ZI-906). Molecular dynamics simulation by 300 nanoseconds, verified the stability of the interaction between ZI-187 and 3IPK. In conclusion, we obtained 3 compounds without apparent cytotoxic activity or antimicrobial activity, with the ability to inhibit the adhesion of *S. mutans* LT-11, and a protocol was established for the search and selection of compounds based on virtual structures that can be applied to different pathogens.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las enfermedades mas prevalentes en el mundo (1). Esta patología es una de las enfermedades orales relacionadas con la alteración de la microbiota oral (2) y se caracteriza por la perforación o daño estructural de los dientes conocidas como lesiones cariosas (3). Para el desarrollo de la caries hay tres factores de riesgo bien conocidos como son factores personales relacionados con el estrato socioeconómico, cobertura de seguro dental, actitudes y conocimientos sobre salud bucal e higiene bucal; factores ambientales orales tales como saliva, flúor, la goma de mascar, pH, bacterias, calcio, fosfatos y proteínas; y finalmente algunos factores que contribuyen directamente al desarrollo de caries, como el diente, la dieta (consumo de azúcares), las biopelículas bacterianas y el tiempo (4).

Los microorganismos orales que no pueden adherirse a una superficie son transportados por el flujo salival fuera de la boca hacia el tracto digestivo, pero muchas bacterias orales poseen mecanismos de adherencia a superficies sólidas (coadhesión), como a los dientes recubiertos de películas salivales, superficies escamosas como tejido epitelial o bacterias que se adhieren a la superficie (coagregación) (5). La capacidad de formar biopelículas es una de las principales características de *S. mutans* y se ha demostrado que expresa factores de virulencia para el desarrollo de biopelículas como las glicosiltransferasas (Gtfs) asociadas a la pared celular median la unión estrecha de *S. mutans* a la superficie del diente, sintetizando glucanos que interactúan con las proteínas de unión a glucanos (GBP) asociadas a la superficie para promover la agregación célula-célula. Por otro lado, *S. mutans* sintetiza varias adhesinas importantes como el antígeno I /

II (también llamado SpaP, Pac), que se une específicamente a una glicoproteína llamada SAG (aglutinina salival) (6), también participa en la adhesión bacteriana al diente, siendo fundamental para la formación de biopelículas, debido a su capacidad para promover la agregación e invasión de la dentina del diente dependiente de colágeno (7,8).

Se han propuesto diferentes estrategias, por ejemplo, moléculas derivadas de productos naturales, iones metálicos y agentes oxidantes e incluso anticuerpos que se unen específicamente a dianas de *S. mutans* (GtfB, GtfC, GtfD, Ag I / II) e inhiben su capacidad para desarrollar biopelículas [10,11]. En las últimas décadas, la búsqueda virtual de inhibidores basados en estructuras se ha interesado en el descubrimiento de fármacos [12-14]; para la microbiología oral el uso de esta estrategia es relativamente nuevo, particularmente en el contexto cariogénico, pero se han propuesto varias proteínas que podrían usarse como moléculas inhibidoras [15]. Gtf-C se ha utilizado como diana en la búsqueda de moléculas con afinidad por esta proteína y para la inhibición selectiva de la formación de biopelículas de *S. mutans* principalmente debido a la capacidad de inhibir la síntesis de expolisacáridos (EPS) *in vitro*, la formación de biopelículas y reducir *in vivo* la incidencia y gravedad de la caries en un modelo de rata [16, 17]. Aunque se ha informado que la adhesina Ag I/II juega un papel importante en las primeras etapas del desarrollo de la biopelícula de *S. mutans*, participando en la adhesión y coagregación con otras bacterias y hongos como *C. albicans*, no hay informes de estudios computacionales. que utilizan esta proteína como diana, por tanto, el objetivo de este trabajo es identificar *in silico* moléculas con efecto inhibidor sobre *S. mutans* Ag I / II, que no tienen actividad citotóxica sobre células humanas.

1.1 Caries dental

La caries dental es una enfermedad no transmisible que se desarrolla con el tiempo, caracterizada por la pérdida del tejido dental (esmalte y dentina) (Figura 1), debido a la producción de ácido resultante del metabolismo bacteriano de los azúcares, involucrando principalmente la interacción entre el diente, las bacterias y los azúcares; por ello, la caries es un proceso dinámico de periodos de desmineralización y re-mineralización que si ocurren por mucho tiempo generan cavidades en los dientes, conocidas como lesiones cariosas (3), en ciertos sitios anatómicamente predilectos de los dientes (9). De acuerdo a estas lesiones, se han establecido unas categorías de caries que incluyen: superficies dentales sanas, en donde no hay evidencia visibles de caries; estadio inicial de caries cuando se visualizan opacidad o decoloración (Lesión de mancha blanca y/o café); estadio moderado de caries donde además de la mancha blanca o café hay ruptura localizada del esmalte y por último, el estadio severo de caries en donde hay una cavidad detectable en esmalte opaco o decolorado con dentina visible (10).

En 2016 la caries dental fue catalogada como la patología mas prevalente en el mundo afectando 2,4 billones de personas (1)(11); esta patología forma parte de las enfermedades bucodentales relacionadas con la alteración de la microbiota oral (2) y aunque no existe una correlación entre el nivel de la lesión cariosa con dolor o inconformidad, el dolor severo puede ser incapacitante o generar una infección y sepsis que puede diseminar hasta afectar la pulpa dental y ocasionalmente podría tener consecuencias sistémicas graves, como la propagación de una infección local y muy raramente, la muerte relacionada con el tratamiento (como complicación de la anestesia) (9). Adicionalmente, la caries dental tiene un aspecto económico importante ya que

es una enfermedad cuyo tratamiento es muy costoso, que consume entre el 5% y el 10% de los presupuestos sanitarios en algunos países y es una de las principales razones de hospitalización de niños en países de ingresos altos (12).

En el contexto colombiano la caries es la enfermedad bucodental más prevalente. Para el país se han realizado cuatro estudios nacionales que de forma progresiva y diferente han buscado identificar el perfil de salud bucal, en los que se ha encontrado que el porcentaje de personas con historia de caries ha sido del 95,5% (Investigación Nacional de Morbilidad, 1965 -1966) y 96,7% (Estudio Nacional de Salud, 1977-1980), en dentición temporal fue del 60,4% para niños de 5 años de edad, 73,8% niños de 7 años; en dentición permanente fue de 65,3%, 45,7% en niños de 12 años, 89,5 % en la adolescencia (15 a 19 años) (Tercer Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB III), 1998). El último estudio realizado (Cuarto Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV) 2014) reporta que el 6.02% de los niños de 1 año han tenido experiencia de caries dental, en los niños de 3 años la experiencia de caries se incrementa considerablemente a 47.10%, para los de 5 años llega a 62.24%, demostrando la necesidad de prevenir desde los dientes temporales para procurar el debido cuidado de los dientes permanentes y finalmente el 88% de la población entre 20 y 34 años, presenta experiencia de caries (13,14).

1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de la caries

El tejido duro dental se compone de esmalte, dentina y cemento. El esmalte es un material duro compuesto casi exclusivamente de mineral, que se compone principalmente de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y cubre la dentina en la corona del diente; el cemento es una sustancia similar a una matriz ósea, compuesta de mineral y colágeno que cubre la raíz del diente; la pulpa dental forma la parte central y contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y nervios (Figura 1). Por otro lado, los dientes están cubiertos por una capa de película salival, que consta de proteínas y glicoproteínas, que facilitan la unión de la microbiota oral a los dientes; esta estructura se llama biopelícula dental (también conocida como placa dental). La caries dental implica interacciones entre la estructura del diente y la biopelícula microbiana formada en la superficie del diente (9).

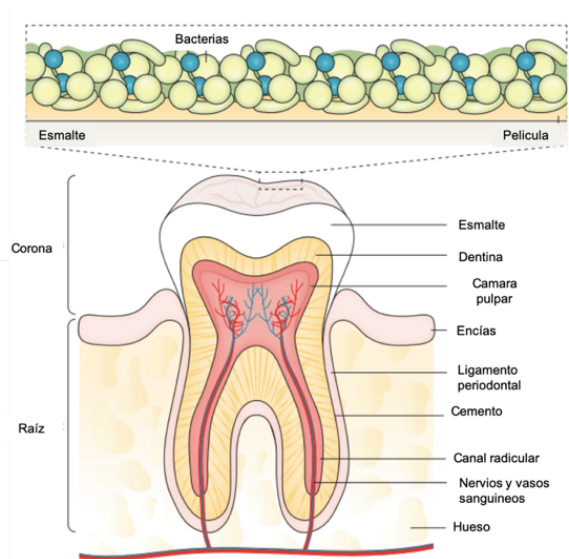


Figura 1. Anatomía normal del diente y biopelícula dental en desarrollo. Modificado de Pitts et al., 2017 (9)

De acuerdo con lo anterior, se han establecido 3 factores de riesgo para el desarrollo de la caries, los factores personales, ambientales orales y factores que contribuyen directamente al

desarrollo de la caries. Los factores personales se relacionan con el estrato socioeconómico, ingresos, cobertura de seguro dental, acceso a sistemas de salud, visita al odontólogo, actitudes, conocimiento sobre la salud bucal e higiene oral, frecuencia y/o técnicas de cepillado y complicaciones orales en relación a otras enfermedades o estados de salud (15–22). Los factores ambientales orales incluyen la saliva, agentes antibacterianos, sellantes dentales, flúor, gomas de mascar, pH, bacterias, calcio, fosfatos y proteínas. Finalmente, el tercero hace referencia a factores que contribuyen directamente al desarrollo de la caries, es decir, el diente, la dieta (consumo de azúcares), las biopelículas bacterianas y tiempo, lo que se conoce como Triada de Keyes modificada por Newbrun 1978 (4).

1.3 Streptococcus mutans

En el contexto microbiológico de la caries, se conoce que los microorganismos orales que no pueden adherirse a una superficie, son transportados por el flujo salival fuera de la boca y hacia el tracto digestivo, pero, muchas bacterias bucales poseen mecanismos de adherencia a superficies sólidas (co-adhesión) como los dientes que están recubiertos de películas salivales, a superficies escamosas como el tejido epitelial o bacterias que ya están adheridas a la superficie (co-agregación) (5).

Streptococcus mutans fue la primera bacteria cariogénica caracterizada (23) y es la de mayor importancia dado que es frecuentemente aislada de individuos con caries (24,25) y posee tres características fundamentales para su papel cariogénico, como lo son la capacidad de producción de exopolisacáridos de la sucrosa que le permiten adherirse al esmalte del diente, la

habilidad para metabolizar los azúcares a ácidos orgánicos (acidogénica) y la habilidad para crecer en un medio ácido (acidúrica) (26). Sin embargo, la principal característica de *S. mutans*, es su capacidad para formar biopelículas, proceso que comienza con el recubrimiento de la superficie del diente a través de la película salival que esta formada por componentes salivales como proteínas ricas en prolina, amilasa, lisozima, histatina, peroxidasa, mucina y componentes bacterianos, por ejemplo, Ftfs (Fructosiltransferasas) Gtfs (Glucosiltransferasas) y ácido lipoteicoico (27).

Se ha demostrado que *S. mutans* expresa factores de virulencia para el desarrollo de biopelículas a través de dos vías, una dependiente y otra independiente de sucrosa; en presencia de sucrosa, las Gtfs asociadas a la pared celular, median la unión estrecha de *S. mutans* a la superficie del diente, sintetizando glucanos que interactúan con proteínas de unión a glucanos (Gbps) asociadas a superficies, para promover la agregación célula-célula; por el contrario en ausencia de sucrosa, *S. mutans* sintetiza varias adhesinas importantes como el Ag I/II (también llamada SpaP, Pac), las cuales se unen específicamente a una glicoproteína de la saliva llamada SAG (Aglutinina salival), este Ag I/II es anclado a la superficie celular bacteriana a través del motivo LPXTG, para lo cual se requiere la participación una enzima sortasa (Sortasa A). Otras proteínas adhesinas que expresa *S. mutans* incluyen proteínas A, asociadas a pared (WapA - *wall-associated protein A*), unas proteínas similares a proteínas de unión a fibronectina (FBP - *fibronectin-binding protein*) de *S. pneumonide* conocidas como PavA (*Pneumococcal adhesion and virulence A*). Adicionalmente, presentan un conjunto de proteínas transportadores de membrada denominadas sistema ABC que incluyen proteínas de unión a ATP y proteínas PspA (*Pneumococcal surface protein A*) y también expresan algunas hemolisinas (6) (Figura 2).

Las Gtfs son uno de los factores de virulencia más estudiados de *S. mutans*, debido a que tienen un papel crítico en la síntesis de exopolisacáridos que permite la formación de una matriz insoluble en agua, proporcionando sitios para colonización microbiana y formación de biopelícula, por esta razón han sido blanco de diversas estrategias dirigidas a inhibir la actividad de estas Gtfs con el fin de bloquear la síntesis de polisacáridos y así impedir la adhesión y formación de la biopelícula de *S. mutans*; estas estrategias incluyen el estudio de compuestos polifenólicos derivados de productos naturales que han mostrado una potente actividad antimicrobiana por mecanismos de inhibición de Gtfs; entre otros inhibidores reportados están los iones metálicos y agentes oxidantes como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , anticuerpos y recientemente se han utilizado estrategias para seleccionar o incluso diseñar nuevas moléculas pequeñas que se unan específicamente al sitio enzimático de Gtf e inhiban su actividad (28).

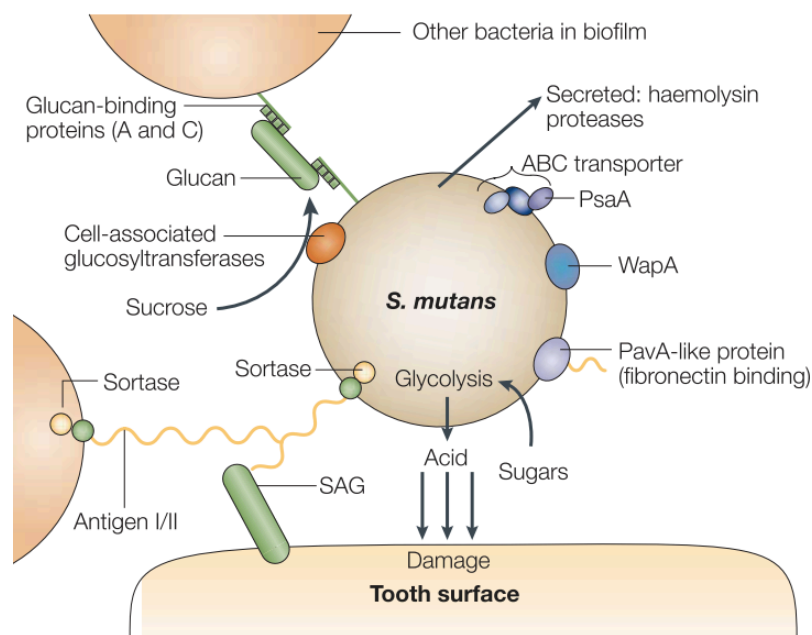


Figura 2. Principales factores de virulencia de *S. mutans* secretados y expresados en la superficie de la pared celular (6).

1.4 Antígeno I/II de *Streptococcus mutans*

El Ag I/II de *S. mutans*, también llamado P1, SpaP, AgB o PAc, es una importante proteína de superficie que funciona como adhesina, que permite la unión de *S. mutans* a la dentina recubierta por una película salival, por lo que ha sido blanco para el diseño de anticuerpos que puedan bloquear la adhesión y co-adhesión de *S. mutans* (29). El Ag I/II es multifuncional y exhiben diversas propiedades de unión, se unen a una glicoproteína salival similar a mucina y pueden distinguir entre formas de SAG inmovilizadas o solubles, esto puede permitir que los estreptococos colonicen los tejidos orales adhiriéndose a las superficies tisulares recubiertas de glucoproteínas salivales que promueve la agregación de células estreptocócicas y contribuye a la eliminación bacteriana *in vivo*. El Ag I/II también media la adhesión de los estreptococos a otros microorganismos orales, interacciones importantes para el desarrollo de la placa dental y para que organismos patógenos como *Porphyromonas gingivalis* colonicen los tejidos orales (30), además de participar en la adhesión de la bacteria al diente, es fundamental en la formación de la biopelícula, puede promover la agregación y la invasión a la dentina del diente dependiente de colágeno (7,8).

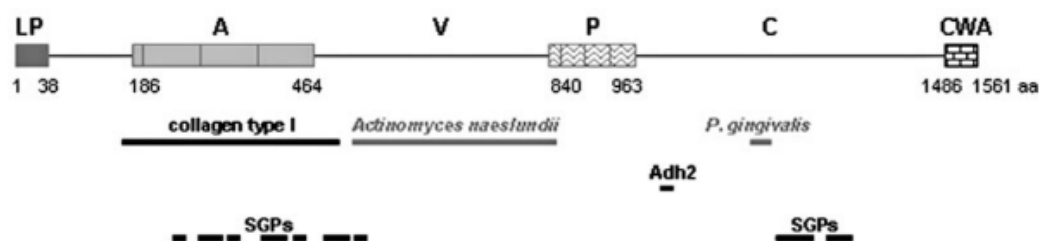


Figura 3. Estructura lineal de proteínas de la familia AgI/II que muestra la localización de regiones funcionales específicas, tomado de (31). Se muestran seis regiones estructurales, basadas en la secuencia primaria: LP, péptido líder; A, repeticiones ricas en Alanina; V, región variable o divergente; P, repeticiones ricas en Prolina; C, región C-terminal; CWA, región de anclaje a la pared celular. Los números de residuos de aminoácidos (aa) se

refieren a *S. mutans* SpaP. Se indica la posición mapeada de adhesintope (Adh2) correspondiente al péptido inhibidor de colonización, así como secuencias definidas en *S. mutans* SpaP implicadas en la unión de glicoproteínas salivales (SGP) y colágeno (líneas negras). La región dentro de *S. gordonii* SspB que interactúa con *Porphyromonas gingivalis* se muestra junto con la región que se cree que interactúa con *A. naeslundii* T14V (líneas grises).

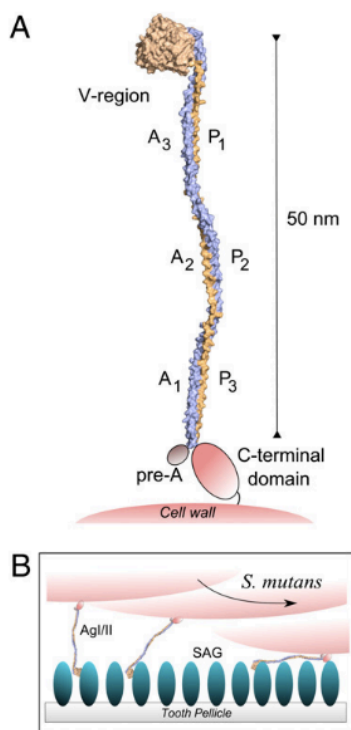


Figura 4. Modelo de la estructura Ag I/II y unión prevista con SAG. (A) La estructura cristalizada de la región A3VP1 de Ag I/II (B) Los estudios de adherencia indican la presencia de dos sitios de unión a SAG, uno dentro de A3VP1 y otro dentro de la región C-terminal, que están muy separados en la estructura Ag I/II. El esquema representa un posible modelo para la unión de Ag I/II a SAG, donde las interacciones ocurren tanto en el extremo distal a través de la región A3VP1, como en un sitio de adherencia secundario mediado por el dominio C-terminal. Tomado de (32)

Las proteínas ortólogas similares a Ag I/II están ampliamente distribuidas en los estreptococos y parecen tener un ancestro común, presentan una estructura primaria relativamente conservada en la que las secuencias N- y C-terminales están bien conservadas con fuertes

homologías (70-90% de similitud de secuencia) y las regiones A y P están menos conservadas que la región C. Las proteínas Ag I/II se componen de seis regiones distintas (Fig. 3), tienen un péptido señal LP (residuos aa 1-38) adyacente a una región N-terminal (residuos aa 60-550) rica en alanina (A), la región C-terminal (residuos de aa 800-1540) incluye repeticiones ricas en prolina (P), lo que confiere una hidrofiliidad considerable; contiene un dominio transmembrana (residuos de aa 1537-1556) y un motivo LPXTG necesario para el anclaje de la pared celular catalizada por la sortasa A. Las repeticiones A y P flanquean un segmento intermedio (región V) donde se agrupan la mayoría de las variaciones de secuencia cepa a cepa (31). Finalmente, es indudable que el Ag I/II contribuye a la virulencia de *S. mutans* y lo mas importante es que en las ultimas décadas las estructuras cristalizadas de diferentes regiones, como el fragmento A3VP1 (32) y el dominio C-terminal (33) han permitido establecer un modelo para la interacción del Ag I/II con la SAG que soporta su importancia (Figura 4).

1.5 Búsqueda virtual de inhibidores

El descubrimiento de fármacos es un proceso cuyo objetivo es identificar una pequeña molécula sintética o una gran biomolécula para una evaluación completa como posible candidato a fármaco, que incluye la identificación de la enfermedad que se va a tratar, su necesidad médica, la selección de un objetivo molecular susceptible del fármaco y su validación para el desarrollo de ensayos *in vitro* seguido de un análisis de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos contra el objetivo. Adicionalmente, requiere una optimización para generar compuestos que exhiban una potencia y selectividad adecuadas hacia el objetivo biológico *in vitro* y que demuestren eficacia en modelos animales de enfermedad, para que posteriormente dichos compuestos se optimicen aún

más con el propósito de mejorar su eficacia y farmacocinética antes de avanzar hacia el desarrollo de fármacos (34). Sin embargo, muchas moléculas presentan problemas de seguridad, cinética, potencia, protección de propiedad intelectual u otros factores y no existe una fórmula simple para producir una molécula candidata clínica viable, aunque la colaboración extensa de química, biología, toxicología y farmacocinética es casi universalmente la norma en los programas modernos de descubrimiento de fármacos (35).

En las últimas décadas la búsqueda virtual de inhibidores basada en estructuras ha tomado gran interés en el descubrimiento de fármacos dado que permite filtrar millones de compuestos desde una base de datos para identificar potenciales candidatos a fármacos en menos tiempo y con menos recursos (34–36). Para el caso de la microbiología oral, aunque es algo más reciente, particularmente en el contexto cariogénico se han propuesto varios blancos que podrían ser usados para la búsqueda de compuestos inhibitorios con esta estrategia (37). Por lo anterior, se ha utilizado la GtfC como blanco para la búsqueda de compuestos con afinidad a esta proteína, para inhibir selectivamente la formación de biopelículas de *S. mutans* y se han propuesto algunos compuestos que *in vitro* inhiben selectivamente la síntesis de exopolisacáridos, la formación de la biopelícula y reducen la incidencia y severidad de caries *in vivo* en modelo ratón (28,38). Sin embargo, estos compuestos solo podrían interferir con una de las vías de formación de biopelículas, la dependiente de sucrosa y dado que *S. mutans* posee múltiples factores de virulencia, entre ellos el AgI/II el cual tiene un papel fundamental en las primeras fases del desarrollo de biopelículas, como es la adhesión y la co-agregación con otras bacterias y hongos como *C. albicans* (39). Algunos análisis virtuales y otros estudios *in vitro* han propuesto moléculas inhibitoras de la sortasa A, que es la

encargada de anclar el Ag I/II a la pared de *S. mutans* (40–42), aunque el Ag I/II no ha sido utilizado directamente para la búsqueda de compuestos inhibitorios con estrategias virtuales.

1.6 Acoplamiento “*Docking molecular*” *molecular*

La bioinformática es una subdisciplina de la biología y las ciencias computacionales que se encarga de adquirir, almacenar, analizar y diseminar la información biológica, en gran parte correspondiente a las secuencias de ADN y aminoácidos. La bioinformática usa programas informáticos con muchos de los algoritmos y bases de datos desarrollados o adaptados en respuesta a nuevos tipos de datos, que tienen muchas aplicaciones, como por ejemplo determinar las funciones de genes y proteínas, establecer relaciones evolutivas y predecir la conformación tridimensional de las proteínas. Otro campo importante para el uso de estas herramientas computacionales es la identificación de nuevos fármacos, el cual permite la detección y el refinamiento de los candidatos a fármaco, puede facilitar la caracterización de los efectos secundarios y predecir la resistencia al fármaco (43). En este contexto se ha determinado que el enfoque tradicional para el desarrollo de fármacos es caro, requiere mucho tiempo y es propenso a fallar, debido al proceso que conduce a la aprobación regulatoria de nuevos productos farmacéuticos, identificando como la principal causa del aumento de los costos a los medicamentos que no cumplen con el estricto proceso de aprobación de registro; costos que se han estimado alrededor de los 800 millones de dólares para el descubrimiento y desarrollo de cada fármaco comercializado con éxito. Por esta razón, muchas empresas biofarmacéuticas utilizan ahora métodos computacionales y herramientas bioinformáticas para reducir esta carga de coste, debido a que el cribado virtual (*Virtual Screening*), la optimización y predicciones de biodisponibilidad

y bioactividad pueden ayudar a guiar la investigación experimental, permitiendo que los programas de investigación se centren en los principales candidatos específicos y evitar potenciales para llevar los medicamentos al mercado más rápidamente, reduciendo costos de dinero y tiempo (44).

Se debe tener en cuenta que antes descubrir cualquier nuevo potencial fármaco, es importante entender la enfermedad bajo consideración y definir la posible causa o causas del trastorno particular e identificar los blancos moleculares para la intervención farmacológica como receptores, proteínas, enzimas, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) que estén involucrados de manera fundamental en los procesos de la enfermedad. La identificación de estos blancos u objetivos farmacológicos se puede realizar mediante métodos computacionales, como el acoplamiento molecular o “*Docking molecular*”, una técnica que predice la estructura intermolecular del complejo dado entre dos moléculas, con el objetivo de encontrar la mejor ubicación del ligando formado por un complejo con una mínima energía global. La técnica de acoplamiento predice la afinidad entre estas biomoléculas o receptores (objetivo del fármaco) y el posible fármaco candidato, dando como resultado una puntuación basada en algoritmos de acoplamiento generados debido a varias posibles combinaciones estructurales, para lo cual el requisito más importante del acoplamiento molecular es la estructura de la proteína o receptor de interés, que esta determinada mediante cristalografía de rayos X o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (45).

Para el acoplamiento molecular la puntuación proporciona un modo para clasificar el posicionamiento de ligandos proporcionales a otros, lo que en teoría, corresponden directamente a la afinidad de unión del ligando por la proteína, de modo que los mejores ligandos de puntuación

sean los más afines y los principales pasos involucrados en la mecánica del acoplamiento molecular incluyen la preparación de la proteína, la predicción de los sitios activos o de acoplamiento, la preparación del ligando y finalmente el acoplamiento, en el cual el ligando se acopla contra la proteína y se analizan las interacciones y en función de la puntuación se selecciona el mejor complejo de proteína-ligando acoplado (46). En esta técnica de acoplamiento, tanto el ligando como la proteína se consideran estructuras rígidas, una aproximación análoga al modelo de unión de "llave-cerradura". Es por ello, que a lo largo de los años se ha experimentado una urgencia por simular la flexibilidad de las proteínas a lo largo del acoplamiento, que surge de la evolución de los modelos de unión de estático a dinámico; la inclusión de características de flexibilidad en el muestreo conformacional conlleva un aumento en el número de grados de libertad del sistema y, en consecuencia, en el esfuerzo computacional, lo que ha generado el desarrollo de herramientas computacionales que se ha venido produciendo en paralelo y a la mejora continua de las tecnologías hardware (47).

1.7 Simulación de dinámica molecular (MD)

La dinámica molecular (MD) es una técnica computacional que simula el comportamiento dinámico de los sistemas moleculares en función del tiempo, tratando a todas las entidades en el cuadro de simulación (ligando, proteína, en presencia de agua) como flexibles, calculando los movimientos de los átomos a lo largo tiempo por la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton y quizás la aplicación de simulación más básica e intuitiva es evaluar la movilidad o flexibilidad de varias regiones de un biomolécula, simplemente examinando una simulación de estructura, se puede cuantificar la cantidad de diversas regiones de la molécula se mueven en

equilibrio y qué tipo de fluctuaciones estructurales sufren. Estas simulaciones también pueden revelar el comportamiento dinámico de las moléculas de agua y los iones de sal, que a menudo son fundamental para la función de las proteínas y la unión del ligando (48). La representación de solventes es un tema clave en la definición de sistemas de simulación, dado que, el solvente es capaz de recuperar la mayoría de los efectos de solvatación del solvente real, incluidos los de origen entrópico como el efecto hidrofóbico y una vez construido el sistema, las fuerzas que actúan en cada átomo se obtienen derivando ecuaciones, de los campos de fuerza, donde la energía potencial se deduce de la estructura. Estos campos de fuerza son ecuaciones complejas, pero son fáciles de calcular y una vez que se obtienen, se utiliza la ley clásica de movimiento de Newton para calcular las aceleraciones y velocidades y para actualizar las posiciones de los átomos. Las simulaciones MD tienen ya más alcanzados escalas de tiempo que comienzan a ser compatibles con los procesos biológicos. En la actualidad, cuando se realizan simulaciones de rutina acercándose a la escala de microsegundos, cambios conformacionales pueden simular eficazmente la unión del ligando, dado que los complejos conformacionales son una mejor representación de las macromoléculas reales, ya que dan cuenta de la flexibilidad y las propiedades dinámicas (incluyendo toda la información termodinámica) y facilitar el emparejamiento con resultados experimentales. Finalmente aunque el cambio de concepto es claro y la tecnología esta avanzando, todavía queda un largo camino de simulaciones biomoleculares, aunque existen herramientas que hacen la configuración de un sistema macromolecular mucho más fácil, e incluso permiten a los no expertos entrar en el mundo de la simulación, por lo que la simulación MD ya es un herramienta valiosa para ayudar a comprender la biología (49).

Capítulo II.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar compuestos con potencial inhibitorio de adhesión a través de la interacción con antígeno I/II de *Streptococcus mutans*.

2.2 Objetivos específicos

Seleccionar compuestos con alta afinidad a sitios de unión del antígeno I/II de *Streptococcus mutans*.

Evaluar la citotoxicidad de los compuestos seleccionados en fibroblastos de ligamento periodontal.

Evaluar si los compuestos seleccionados tiene efecto sobre el crecimiento y la adhesión de *Streptococcus mutans*.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Búsqueda virtual y selección de compuestos

3.1.1 Selección de proteínas y análisis de similitud de secuencia:

Se seleccionó en formato FASTA una secuencia de 1566 aminoácidos de la adhesina Ag I/II de *S. mutans* (AFR75221.1), de la base de datos de proteínas del centro nacional para la biotecnología (NCBI “*National Center for Biotechnology*”), presentada a continuación:

>AFR75221.1 AgI/II [*Streptococcus mutans*]

MKVKKTYGFRKSKISKTLCGAVLGTVA AVSVAGQKVFADETTTSDVDTKVVG
TQTGNPATNLPEAQGSASKEAEQSQNQAGETNGSIPVEVPKTDLDQAAKDAKSAGVNV
VQDADV NKGTVKTAEEAVQKETEIKEDYTKQAEDIKTTDQYKSDVAAHEAEVAKIKA
KNQATKEQYEKDMAAHKAEVERINAANAASKTAYEAKLAQYQADLAAVQKTNAANQ
AA YQKALAA YQ AELKRVQEANAAAKAAYDTAVAANNAKNTEIAAANE EIRKRNATA
KAEYETKLAQYQ AELKRVQEANAANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKAAYEA
AVAANNAKNAALTAENTA IQRNENAKATYEAALKQYEADLAAVKKANAANEADYQ
AKLTAYQTELARVQKANADAKATYEA AVAANNAANAALTAENTA IKKRNADAKADY
EAKLAKYQADLAKYQKDLADYPVKLKAYEDEQASIKAAALAELEKHKNEDGNLTEPSA
QNLVYDLEPNANLSLTTDGKFLKASAVDDAFSKSTSKAKYDQKILQLDDLDITNLEQSN
DVASSMELYGNFGDKAGWSTTVSNNSQVKWGSVLLERGSATATYTNLQNSYYNGKK

ISKIVYKYTVDPESKFQGQKVWLGIFTDPTLGVFASAYTGQVEKNTSIFIKNEFTFYDEDG
 KPINFNALLSVASLNREHNSIEMAKDYSGKFKISGSSIGEKNMIYATDTLNFQEGEG
 GSRWTMYKNSQAGSGWDSSDAPNSWYGAGAIKMSGPNNHVTVGATSATNVMPVSDM
 PVVPGKDNTDGKKPNIWYSLNGKIRAVNVPKVTKEKPTPPVKPTAPTPTYETEKPLKP
 APVAPNYEKEPTPPTRTPDQAEPNKPPIPTYETKPLEPAPVEPSYEAEPPTPTRTPDQAEPN
 KPTPPTYETEKPLEPAPVEPSYEAEPPTPTPDQPEPNKPVEPTYEVIPTPPTDPVYQDLP
 TPPSVPTVHFHYFKLAVQPQVNKEIRNNNDVNIDRTLVAKQSVVKFQLKTADLPAGRDE
 TTSFVLVDPLPSGYQFNPEATKAASPGFDVAYDNATNTVTFKATAATLAMFNADLTKS
 VATIYPTVVGQVLNDGATYKNNFTLTVNDAYGIKSNVVRVTTPGKPNPDNPNNNYIK
 PTKVKNENGVVIDGKTVLAGSTNYYELTWDLQYKNDRSSADTIQKGFYYVDDYPEE
 ALELRQDLVKITDANGNEVTGVSVDNYTSLEAAPQEIRDVLSKAGIRPKGAFQIFRADNP
 REFYDTYVKTGIDLKIVSPMVVKKQMGQTGGSYENQAYQIDFGNGYASNIINNVPKINP
 KKDVTLTLDPADTNNVDGQTIPLNTVFNYRLIGGIIPANHSEELFEYNFYDDYDQTDGHY
 TGHYKVFQKVDITFKDGSIIKSGTELTQYTTAEVDTTKGAITIKFKEAFLRSVSIDSVFQA
 ESYIQMKRIAVGTFENTYINTVNGVTYSSNTVKTTTTPEDPTDPTDPQDPASPRTSTVINYK
 PQSTAYQPSSVQKTLPNTGVTNNAYMPLLGIIGLVTSFSLGLKAKKD

La secuencia fue llevada al sistema automatizado para el modelamiento 3D SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), no para modelar una nueva proteína, sino para la búsqueda de estructuras cristalizadas de proteínas del Ag I/II. Debido a que no se encontró un cristal completo del AgI/II de *S. mutans* se seleccionaron del banco de proteínas (PDB: *Protein data Bank*) del RCSB (*Research Collaborative for Structural Bioinformatics*) (50), dos cristales de proteínas que corresponden a los extremos de la proteína AgI/II y que se han involucrado con

la unión a la SAG humana y son la región A3VP1 (PDB ID: 3IPK) de 496 aa (32) y la región carboxi-terminal de 516 aa (PDB ID: 3QE5) (33). Posteriormente, con el objetivo de revisar la posibilidad de afectar proteínas humanas o de otros organismos, por similitud de secuencias o estructurales homologas, descargaron las secuencias de estas dos proteínas en formato FASTA y se realizó una búsqueda de secuencias proteicas similares (51), mediante la herramienta de búsqueda de alineación local básica de proteínas (BLAST-P: *Protein Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI, usando la base de datos humana (TaxID: 9606) y procariota (TaxID: 1), sin incluir *S. mutans* (TaxID: 1309). Adicionalmente, se realizó un BLAST-P utilizando una base de datos específica para bacterias de cavidad oral en la base de datos del microbioma oral humano (<http://www.homd.org/>) (52,53). Por ultimo, el servidor FAT-CAT (*Flexible structure Alignment by Chaining Aligned fragment pairs allowing Twists*) (54) se utilizó para buscar estructuras (rígidas) proteicas similares, teniendo en cuenta solo similitudes con un P-valor < 0,05.

Las secuencias en formato FASTA de las cadenas A de los cristales de las proteínas 3IPK y 3QE5, usadas para los análisis de homología de secuencia y estructural fueron:

>3IPK:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

AANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKAAYEAAVAANNAANAALTAENT
 AIKKRNADAKADYEAKLAKYQADLAKYQKDLADYPVKLKAYEDEQTSIKAALAELEK
 HKNEDGNLTEPSAQNLVYDLEPNANLSLTTDGGKFLKASAVDDAFSKSTSKAKYDQKILQ
 LDDLITNLEQSNDVASSMELYGNFGDKAGWSTTVSNNSQVKWGSVLLERGSATATY
 TNLQNSYYNGKKISKIVYKYTVDPKSKFQGQKVWLGIFTDPTLGVFASAYTGQVEKNTS

IFIKNEFTFYDEDGKPINFDNALLSVASLNREHNSIEMAKDYSGKFKISGSSIGEKNGMI
 YATDTLNFKQGEGRWTMYKNSQAGSGWDSSDAPNSWYGAGAIKMSGPNNYVTVG
 ATSATNVMPVSDMPVVPKDNNTDGKKPNIWYSLNGKIRAVNVPKVTKEKPTPPVKPTA
 PTKPTYETEKPLKPAPVAPNYEKEPTPPTRLEHHHHHH

>3QE5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MASMTGGQQMGRIHFHYFKLAVQPQVNKEIRNNNDINIDRTLVAKQSVVKFQLKTADLP
 AGRDETTSFVLVDPLPSGYQFNPEATKAASPGFDVTYDNATNTVTFKATAATLATFNADLTKSV
 ATIYPTVVGQVLNDGATYKNNFTLTVNDAYGIKSNVVRVTTGPKNDPNDPNNNYIKPTKVKN
 ENGVWIDGKTVLAGSTNYEELTWDLQYKNDRSSADTIQKGFYYVDDYPEEAELELRQDLVKITD
 ANGNEVTGVSVDNYTNLEAAPQEIRDVLSKAGIRPKGAFQIFRADNPREFYDTYVKTGIDLKIVS
 PMVVKKQMGQTGGSYENQAYQIDFGNGYASNIVINNVKINPKKDVTLLDPADTNNVDGQTIP
 LNTVFNYRLIGGIIPANHSEELFKYNFYDDYDQTDGHDYTGQYKVFADITLKNGVIIKSGTELQ
 YTTAEVDTTKGAITIKFKEAFLRSVSDSAFQAESYIQMKRIAVGTFENTYINTVNGVTYSSLEHH
 HHHH.

3.1.2 Selección de sitios de unión de ligando

La identificación y selección de sitios de unión “*Pockets*” de las proteínas 3IPK y 3QE5 se llevo a cabo utilizando dos meta-servidores con algoritmos diferentes, el MetaPocket 2.0 (55) el cual se basa en la geometría de las proteínas para la identificación de los sitios de unión y el COACH (56) que se basa en la ubicación de los ligandos que se han obtenido en cristales de

proteínas. Cada predictor generó 3 sitios de unión de ligandos para cada proteína, es decir que se obtuvieron 6 sitios de unión de ligado para cada proteína, 3IPK y 3QE5.

3.1.3 Acoplamiento “Docking” molecular

Las estructuras cristalizadas de las proteínas 3IPK y 3QE5 fueron obtenidas en formato PDB y se editaron en el programa AutoDockTools 4.0 (<http://mgltools.scripps.edu>) (57), donde se removieron manualmente los dímeros (Cadena B para ambas proteínas), aguas y otros ligandos como sulfato, iones de calcio, ácido fenilmetanosulfónico para 3IPK y para 3QE5 D-alfa-glucosa e iones de calcio y magnesio; también se le adicionaron hidrógenos polares, se protonaron átomos y se guardaron las proteínas editadas en formato PDBQT.

La búsqueda de compuestos con afinidad a las proteínas del AgI/II, se ejecutó en el Centro de Computación Avanzada de Texas (TACC: *Texas Advanced Computing Center*; Austin, TX) utilizando tres librerías que contienen pequeñas moléculas disponibles comercialmente, compiladas para su uso con el portal de descubrimiento de fármacos basado en la web que proporcionan una interfaz para ejecutar el programa Autodock Vina en la supercomputadora "Lonestar", uno de los recursos informáticos de alto rendimiento diseñados, administrados y mantenidos por TACC, accesible a través de <https://portal.tacc.utexas.edu>. Para la búsqueda de compuestos, las proteínas 3IPK y 3QE5 se cargaron en dicho portal, con unas dimensiones x-y-z de 24x24x24 mas las coordenadas obtenidas de los predictores y se utilizaron la librería "ZINC (Lrg)" de ~ 642.759 moléculas similares a fármacos (sin carga, Lipinski "ROF"(Rule of five)), la librería "ZINC (Sm)" de ~ 46.702 moléculas que combina las librerías de cribado de Maybridge,

Hitfinder y Chembridge. y la librería "ZINC Natural Cmpds (Large)" de 194.090 productos naturales de moléculas pequeñas extraídos de la base de datos ZINC15 (58), esta librería contiene tanto "productos naturales" como moléculas de la Medicina Tradicional China (MTC) que están comercialmente - disponible en estado puro. Lo anterior corresponde a unas librerías que incluyeron un total de ~883,551 moléculas pequeñas similares a medicamentos comercialmente disponibles.

3.1.4 Selección de compuestos

Teniendo en cuenta que se utilizaron dos cristales de proteínas (3IPK y 3QE5), y que se obtuvieron 6 sitios de unión de ligando para cada una, 3 por MetaPocket y 3 por COACH y que la búsqueda de compuestos se hizo en 3 librerías diferentes, se ejecutaron un total de 36 acoplamiento "dockings" moleculares, de los cuales por defecto se obtuvieron 1.000 compuestos por cada acoplamiento, para un total de 36.000 compuestos ordenados de acuerdo a sus mejores valores de afinidad dado en kcal/mol. Para realizar un filtro de los 36.000 compuestos obtenidos se utilizaron dos metodologías, en la primera se seleccionaron arbitrariamente 30 compuestos con menor energías de interacción en cada acoplamiento realizado (Se asume que, a menor energía de interacción, mayor es la afinidad entre los compuestos por los ligandos), se registraron en una sola tabla y de allí se seleccionaron arbitrariamente 10 compuestos con las mejores energías.

Para el segundo método de selección, los códigos de todos los compuestos (36.000) obtenidos en el primer acoplamiento se incluyeron en una matriz de Excel (Versión 16.16.25), luego se preparó una secuencia de comandos o "script" (Anexo 1), ejecutada en el paquete R-studio

(Versión 1.0.156) para buscar los compuestos que se encontraron con mayor frecuencia en los diferentes sitios de unión de ligando en todos los acoplamientos, seleccionando los 10 compuestos que presentaron más sitios de unión. De cada metodología se seleccionaron arbitrariamente 10 compuestos. Sin embargo, se encontró un compuesto en común para ambas metodologías, dando una selección de 19 compuestos, a los que se les realizó un re-acoplamiento local usando las coordenadas de los predictores (Metapocket y COACH-D) y las dimensiones x-y-z de 24x24x24, en el programa AutodockVina (1.1.2) aumentando el parámetro de exhaustividad a 20 (en el primer acoplamiento es 8 por defecto), para lograr un refinamiento en los puntajes o energías de acoplamiento.

3.1.5 Predicción in silico de propiedades ADME de los compuestos seleccionados

Se realizó un análisis *in silico* utilizando la aplicación QuikProp (Versión 3.2) del software Schrödinger (59), de acuerdo a (51) con algunas modificaciones, para la predicción de los perfiles farmacocinéticos como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) y establecer parámetros fisicoquímicos como peso molecular (MW), área superficial accesible al solvente (SASA); área de superficie polar total (PSA); número de enlaces rotativos (NRB); donantes de enlaces de hidrógeno (HBD); aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA); predicción de coeficientes de reparto octanol / agua (QP logPo / w); predicción de la solubilidad acuosa (QP LogS); permeabilidad aparente en células Caco-2 (nm/s), permeabilidad aparente en células MDCK (nm/s), predictor de permeabilidad cutánea (QP logKp); velocidad de transporte transdérmico (Max TTR); violaciones de la Regla de los Cinco de Lipinski (VLR5); porcentaje de absorción oral humana (% HOA); modelo cualitativo de absorción oral humana (Qual MHOA). Por último,

se calculo el pKa de los compuestos mediante el programa Marvin Sketch versión 19.6.0 (<http://www.chemaxon.com>). Posterior a los análisis anteriores, se descartaron los compuestos que tuvieran más de dos violaciones a la Reglas de Lipinski y que incumplieron mas de dos de los parámetros fisicoquímicos estándar establecidos por el 95% de los medicamentos conocidos, según los repositorios del programa QuikProp de Schrödinger.

3.1.6 Predicción computacional de toxicidad de los compuestos

Las estructuras de los compuestos en formato SMILE (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) fueron llevadas al programa Protox-II (60,61), para predecir la toxicidad aguda, hepatotoxicidad, citotoxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad e inmunotoxicidad. Además, se calculó la dosis letal 50 (DL50) (en mg/kg) de los compuestos y se clasificaron se según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS “*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*”) en 6 grupos de la siguiente manera:

Clase I: fatal en caso de ingestión ($LD50 \leq 5$)

Clase II: fatal en caso de ingestión ($5 < LD50 \leq 50$)

Clase III: tóxico en caso de ingestión ($50 < LD50 \leq 300$)

Clase IV: nocivo en caso de ingestión ($300 < LD50 \leq 2000$)

Clase V: puede ser nocivo en caso de ingestión ($2000 < LD50 \leq 5000$)

Clase VI: no tóxico ($LD50 > 5000$)

En este análisis se utilizó la clorhexidina como fármaco de referencia, uno de los agentes antisépticos más comúnmente recetados en el campo dental, los valores experimentales de dosis letal 50 por vía oral en ratones de este fármaco se tomaron de la ficha técnica de Pfizer clorhexidina (62), mientras que los valores predictivos de dosis letal 50 se obtuvieron mediante el PROTOX-II. Se seleccionaron compuestos por encima de la clase 3 y sin ninguna probabilidad de toxicidad.

3.1.7 Análisis de tipo de interacción compuesto - proteína

Después de aplicar todos los pasos para la búsqueda y selección virtual de compuestos con afinidad a las proteínas 3IPK y 3QE5, finalmente se obtuvieron 4 moléculas. Sin embargo, debido a la disponibilidad comercial se excluyó una de ellas, para continuar con los compuestos ZINC19835187 (**Código de la base de datos Zinc15**), ZINC19924906 y ZINC19924939, los cuales serán abreviados a partir de ahora como ZI-187, ZI-906 y ZI-939, respectivamente. Los compuestos se dibujaron en el programa Marvin Sketch versión 19.6.0 (<http://www.chemaxon.com>) para análisis subestructurales y se utilizó el banco de fármacos (<https://www.drugbank.ca>) para la búsqueda de estructuras químicas similares. Además, se identificó la posibilidad de interacciones por puentes de Hidrogeno entre los compuestos y los dos fragmentos proteicos 3IPK - 3QE5 (63), para lo cual se construyó un solo archivo en formato PDB de cada compuesto con la proteína utilizando el software Chimera (Versión 1.13) (64) y se caracterizaron los tipos de interacciones en el programa biovia discovery studio (65). El servidor web swissADME (<http://www.swissadme.ch/>) se utilizó para predecir las características de solubilidad en agua de los compuestos, utilizando un consenso de 3 métodos Log S (ESOL), Log S (Ali) y Log S (SILICOS- IT) (66) y para estimar una concentración necesaria para que los

compuestos pudieran interactuar con su proteína blanco, se usaron los valores de energía de unión libre (ΔG) de los compuestos resultantes de los cálculos del re-acoplamiento, para hacer un cálculo matemático con la constante de inhibición (K_i , mol/L) de los compuestos, basado en la relación matemática entre la constante de inhibición (K_i) y ΔG , mediante la expresión $\Delta G = RT \ln K_i$, donde R es la constante de gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura estándar (298,15 K), K_b es la constante de unión y K_d es la constante de disociación (51,67).

3.2 Evaluación *in vitro* de los compuestos seleccionados

3.2.1 Soluciones de trabajo de los compuestos

Los compuestos adquiridos se encontraban diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% a una concentración de 10mM, lo que corresponde a 4796 $\mu\text{g/ml}$ para ZI-187 (PM=479,6), 4075,9 $\mu\text{g/ml}$ para ZI-939 (PM=470,6) y 4535,6 $\mu\text{g/ml}$ para ZI-906 (PM=453,6). Para los ensayos de citotoxicidad la mayor concentración de DMSO usada fue 1% (68). Para los ensayos de actividad antimicrobiana y adhesión se utilizó una concentración máxima de DMSO de 10% (69,70).

3.2.2 Ensayo de citotoxicidad en células FLP

Este ensayo se realizó en el laboratorio de toxicología genética del grupo de investigación de genética, regeneración y cáncer de la Universidad de Antioquia, con el objetivo de evaluar la

capacidad citotóxica de los compuestos mediante la evaluación del crecimiento de células de fibroblasto de ligamento periodontal (FLP) con los compuestos ZI-187, ZI-906 y ZI-939 a una concentración de 100 μ M (DMSO 1%). Las células FLP se cultivaron en medio de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL), penicilina G (100 UI/ml) (Gibco BRL) y estreptomycin (100 μ g/ml) (Gibco BRL) en platos de 24 pozos y se trataron las células durante 24h con cada uno de los compuestos en las concentraciones mencionadas. Posteriormente, se procedió a realizar una citometría de flujo con yoduro de propidio (PI: *Propidium Iodide*) para evaluar la viabilidad celular y descartar posible citotoxicidad de los compuestos. Para este ensayo se utilizó como control del solvente células FLP tratadas con DMSO 1% y como control de referencia las células sin ningún tipo de tratamiento.

3.2.3 Ensayo de actividad antimicrobiana sobre Streptococcus mutans - Lt11 (UB579 WT) y Candida albicans NCPF 3179

Este ensayo, junto con el ensayo de adhesión que se describirá mas adelante, se estandarizaron en el laboratorio de investigación en farmacia y ciencias moleculares de la universidad Liverpool John Moores del Reino Unido (UK), Inglaterra. Se utilizaron las bacterias *S. mutans* - Lt11 (UB579 WT) (71) donada por la Dra. Jane Brittan del laboratorio de Microbiología oral de la Escuela de Odontología de Bristol de la Universidad de Bristol (UK), Bristol (también donó la cepa *S. mutans* SpaP-, que se mencionara mas adelante) y la levadura *C. albicans* NCPF 3179 (72), los cuales fueron reconstituidos en agar BHI (*Brain heart infusion*) BD®, posteriormente cultivados toda la noche en caldo BHI BD® a 37°C en agitación a 250 RPM.

Al día siguiente *S. mutans* Lt11 (UB579 WT) y *C. albicans* NCPF 3179 en fase logarítmica, fueron ajustados a una concentración entre 0,08 - 0,1 a un OD_{600nm}, luego se adicionaron 180 µl de los microorganismos en caldo BHI a una microplaca de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA) y se agregaron 20 µl de los compuestos quedando a concentraciones de 1000, 100, 10 µM. Como control negativo (muerte) se utilizó clorhexidina digluconato al 0,2% (Farpag®), mientras los microorganismos solo en medio de cultivo se usaron como control positivo de crecimiento, al igual que tratados con DMSO 10%, (73). Posterior a la incubación por 24 horas a 37°C en agitación a 250 RPM, se midió la absorbancia en espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ (BioTek®) a 600nm, para evaluar el crecimiento celular y establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de acuerdo con la menor concentración de los compuestos que inhibieran el crecimiento bacteriano.

3.2.4 Ensayo de adhesión en Streptococcus mutans - Lt11 (UB579 WT)

S. mutans - Lt11 (UB579 WT) fue cultivada en caldo BHI (BD®) toda la noche a 37°C en agitación a 250 RPM. Al día siguiente se descartó el medio de cultivo y se lavaron las bacterias con solución salina por centrifugación a 3000 RPM durante 10 minutos. Posteriormente, se ajustaron las bacterias en solución salina a una absorbancia de 1 (OD_{600nm}) en espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ (BioTek®), y se inocularon 180 µl en microplaca de 96 pozos (NEST®, Ref: 701001) con 20 µl de los compuestos quedando a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5 µM, durante 3 horas a 37°C en agitación a 250 RPM (74). Como controles se utilizaron la cepa *S. mutans* SpaP- (mutante para el AgI/II también llamada SpaP).

3.3 Análisis de datos

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en 3 experimentos independientes. Los porcentajes de viabilidad celular se reportaron como %PI negativas \pm SEM (error estándar de media) de tres experimentos independientes y se analizaron mediante una ANOVA (análisis de varianza) de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Para los análisis de concentración mínima inhibitoria de *S. mutans* y *C. albicans* y de inhibición de adhesión, los datos de OD se normalizaron a porcentajes, se les realizaron una prueba de normalidad D'Agostino & Pearson omnibus y Shapiro-Wilk; posteriormente se realizó una ANOVA, análisis de varianza, con comparaciones múltiples de Dunnett contra el control *S. mutans* y *C. albicans* tratadas con DMSO 10%. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) y se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

3.4 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se seleccionó el compuesto ZI-817 con el objetivo de identificar si este, podría generar algún cambio en la morfología de *S. mutans*, para lo que se realizó un ensayo de adhesión siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con algunas modificaciones. Para este caso se usó *S. mutans* - Lt11 sola y tratada con el compuesto ZI-187 a una concentración de 0,1 mM; se sembraron usando portaobjetos *Thermo Scientific Nunc Lab-Tek and Lab Tek II Chamber Slides*. Después de la incubación por 3 horas a 37°C en agitación a 250 RPM, cada muestra fue lavada 3 veces con PBS

(*Phosphate-Buffered Saline*) para remover la solución salina y las células no adheridas, luego se fijaron las muestras con gluteraldehído al 2,5 % (en PBS 0,1M) por 24 horas a 4°C. Finalmente, los portaobjetos se lavaron 3 veces con agua destilada y se deshidrataron por inmersión en soluciones de concentraciones ascendentes 70, 90 y 100% de etanol (por 10 minutos en cada una) y secadas toda la noche en cabina de flujo laminar. Las muestras fueron cubiertas con oro y visualizadas en el microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA-200™ con un voltaje de aceleración de rango variable de 1–30 KV.

3.5 Simulaciones de dinámica molecular

Dado que de los 3 compuestos evaluados, el mejor compuesto fue el ZI-187, en los estudios computacionales y los experimentales de acuerdo con los resultados de inhibición de la adhesión de *S. mutans* – Lt11, se utilizó este compuesto con el objetivo de analizar y describir las interacciones que podrían ser responsables de la inhibición de la adhesión, para lo cual se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM), tomando el complejo (proteína-ligando), en donde el compuesto ZI-187 se acopló en el *pocket* 1 (establecido por el predictor - COACH) de la proteína 3IPK, ya que en este sitios de interacción fue donde se presentó la afinidad de unión más alta tras los ensayos de acoplamiento molecular. Las simulaciones de DM fueron llevadas a cabo usando el programa GROMACS 2018 (75). El complejo ZI-187/3IPK y la proteína 3IPK en su estado apo (denominación dada al estado de referencia de la proteína) fueron usados como coordenadas iniciales para las simulaciones DM. Para la proteína el campo de fuerza amber ff99SB-ILDN fue usado (76); el ligando fue parametrizado usando las herramientas GAFF (Campo de fuerza general de amber) (77) y ACPYPE (78). Ambos sistemas fueron solvatados

usando un modelo de agua TIP3P y una caja dodecaédrica, luego las cargas de cada sistema fueron neutralizadas usando iones de Na^+ y Cl^- , además un exceso de ellos fue agregado hasta alcanzar una concentración de NaCl de 0.15M. Seguido se realizó una minimización de energía con el fin de relajar el sistema y evitar posibles choques estéricos durante 50,000 pasos usando un algoritmo de descenso de gradiente. Una vez minimizada la energía potencial de los sistemas, éstos fueron sometidos a una serie de equilibraciones, la primera fue bajo condiciones del ensamble canónico, NVT (número de partículas, volumen y temperatura constante) por 250 ps, aplicando una restricción sobre los átomos pesados del sistema de $1000 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. Luego se realizaron 4 equilibraciones bajo condiciones del ensamble isotérmico-isobárico, NPT (número de partículas, presión y volumen constante), cada una por 250 ps; en las equilibraciones NPT se eliminaron gradualmente las restricciones de los sistemas usando primero $1000 - 100 - 10$ y finalmente $1 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. En total se realizaron 1,25 ns de equilibración. Finalmente, ambos sistemas fueron sometidos a una etapa de producción de 300 ns, usando un paso de tiempo de 2 fs. Tanto las equilibraciones como las producciones fueron llevadas a cabo usando una temperatura de 310K ($36,85 \text{ }^\circ\text{C}$) y una presión de 1 bar. Para el control de la temperatura se implementó el termostato V-rescale y para el control de la presión se usó el barostato Parrinello Rahman. Una vez finalizadas las simulaciones se realizó un seguimiento a descriptores como el Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), el Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) y puentes de hidrógeno presentes en el complejo proteína-ligando; para esto se hizo uso de las herramientas contenidas en GROMACS: `g_rms`, `g_rmsf` y `g_hbond`.

CAPITULO IV

3 RESULTADOS

4.1 Selección de proteínas y análisis de similitud de secuencia

En la búsqueda del cristal de la proteína Ag I/II de *S. mutans*, se encontraron 4 cristales de las cadenas A de diferentes regiones de esta proteína, denominados 3ipk.1.A, 3qe5.1.A, 1jmm.1.A y 3opu.1. A (Figura 2). El resultado obtenido de la precisión esperada del modelo construido (GMQE) con la alineación y secuencia de la proteína Ag I/II, fue de 0,22 para ambas secuencias, 3IPK y 3QE5 y menor para los otros dos cristales GMQE de 0,15 y 0,12 para 1JMM y 3OPU, respectivamente (Los números más altos indican una mayor confiabilidad). Por otro lado, el grado de natividad de las características estructurales observadas en el modelo en una escala global (QMEAN), fue mejor para 1JMM y 3OPU cuyos valores fueron mas cercanos a 0 (-0,24 y 0,06, respectivamente) y para 3IPK fue 0,87 y 0,44 los cuales son valores óptimos dado que la baja calidad de los modelos se indica con QMEAN por debajo de - 4,0 (Tabla 1). Adicionalmente, se encontró que hay una mayor cobertura de la proteína Ag I/II, por parte de los cristales de las proteínas 3IPK, la cual incluye casi en su totalidad los residuos de 1JMM y 3QE5 los residuos de 3OPU, por lo cual se seleccionaron los cristales de las proteínas 3IPK y 3QE5.

Tabla 1: Datos de búsqueda de estructura del Ag I/II de *S. mutans*. Resultados obtenidos de cristales de proteínas, usando como plantilla la secuencia del Ag I/II de *S. mutans*, en el programa Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

Model	Template	GMQE	QMEAN	Seq - Similarity	Range aa (total)	Coverage	Seq - Identity (%)
1	3ipk.1.A	0.22	0.87	0.59	392 – 870 (479)	0.31	94.77
2	3qe5.1.A	0.22	0.44	0.60	996 – 1482 (487)	0.32	98.38
3	1jmm.1.A	0.15	-0.24	0.58	464 – 823 (360)	0.23	93.04
4	3opu.1.A	0.12	0.06	0.60	1152 – 1489 (337)	0.22	97.05

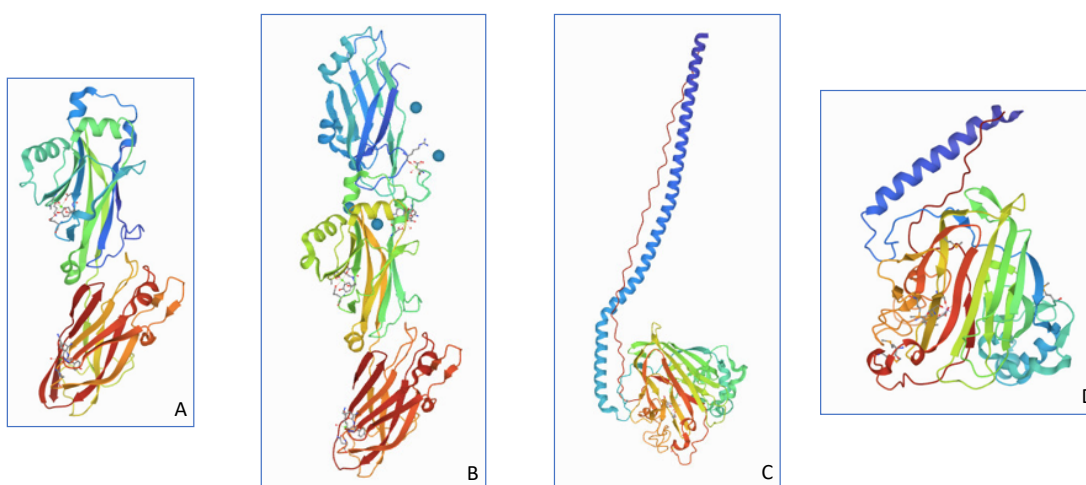


Figura 5. Estructuras de los cristales de las proteínas asociadas al Ag I/II de *S. mutans*. Estructuras obtenidas del Protein Data Bank (PDB) de los cristales 3OPU (A) y 3QE5 (B) de la región C-terminal del Ag I/II de *S. mutans* y estructuras de los cristales de 3IPK (C) y 3JMM (D) de la región A3VP1 del Ag I/II de *S. mutans*.

Posterior a la selección de las proteínas, las secuencias de 3IPK y 3QE5 se utilizaron para la búsqueda de secuencias proteicas homólogas (Anexo 2), encontrando que para el fragmento 3IPK de la adhesina Ag I/II de *S. mutans*, se presentaron buenos alineamientos con proteínas humanas (valor e: 0,003), aunque con baja cobertura e identidades de secuencia (16% y 36,26%, respectivamente) (Tabla 2), las cuales corresponden principalmente a una proteína humana llamada Zonadhesina. Por el contrario, para los alineamientos del fragmento 3QE5 con proteínas

humanas se obtuvieron bajas calidades (valores e: 0,25; 4,4; 9,1), correspondientes a la cadena A de una proteína del sistema ubiquitina, la cadena B del correpressor 1 y la cadena A de una ATPasa del retículo endoplasmático (Tabla 2).

Tabla 2. Datos homología con secuencias humanas. Descripción de las secuencias de aminoácidos obtenidas de alineamientos significativos con 3IPK y 3QE5, usando búsqueda BLAST-P (NCBI) limitada a registros que incluyen secuencias de humanos (taxid: 9605).

AgI/II fragment	Protein	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
3IPK (A3VP1 Region)	zonadhesin isoform 3 precursor	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	NP_003377.2
	zonadhesin splice variant 6	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04413.1
	zonadhesin splice variant 5	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04412.1
	zonadhesin variant 1	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01431.1
	zonadhesin variant 4	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01434.1
	zonadhesin variant 2	<i>Homo sapiens</i>	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01432.1
3QE5 (C- Terminal Region)	Chain A, The Crystal Structure of E2-25k And Ubiquitin Complex	<i>Homo sapiens</i>	36.6	36.6	15%	0.25	31.03%	3K9P_A
	Chain B, REST COREPRESSOR 1	<i>Homo sapiens</i>	32.7	32.7	5%	4.4	58.62%	2IW5_B
	Chain A, Transitional Endoplasmic Reticulum Atpase	<i>Homo sapiens</i>	31.6	31.6	5%	9.1	51.72%	4KDI_A

En relación a la búsqueda de homología de las secuencias con proteínas de otras bacterias (excluyendo *S. mutans*), ambos fragmentos, 3IPK - 3QE5, tienen proteínas homólogas con la misma especie bacteriana, 8 *Streptococcus*: *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. macacae*, *S. orisratti*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. cricetid*, *S. sanguinis* y *Granulicatella adiacens*; adicionalmente para las homologías del fragmento 3IPK se encontraron 5 especies más de *Streptococcus*: *S. troglodytae*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. oralis* y *S. constellatus*. Las homologías encontradas usando 3IPK y 3QE5, corresponden a secuencias de la región V (Variable) de la proteína I/II, a las proteínas receptoras de aglutininas y al dominio de anclaje LPXTG de adhesinas de la familia del Ag I/II (Tabla 3).

Tabla 3. Datos búsqueda de homología con secuencias procariotas. Descripción de las secuencias de aminoácidos que produce alineaciones significativas con 3IPK y 3QE5 mediante la búsqueda BLAST-P (NCBI) limitada a registros que incluyen: Procaryotae (taxid: 2) y excluyen: humanos (taxid: 9605) y *Streptococcus mutans* (taxid: 1309). El nombre de las bacterias resaltado en rojo representa a aquellas que se encuentran en un solo de los fragmentos 3IPK o 3QE5.

Ag/II fragment	Protein	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
3IPK (A3VP1 Region)	agglutinin receptor SSP-5	<i>Streptococcus troglodytae</i>	978	1200	98%	0.0	96.93%	BAQ24775.1
	agglutinin receptor	<i>Streptococcus anginosus</i>	882	882	98%	0.0	88.75%	PRT64203.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus intermedius</i>	837	837	96%	0.0	85.00%	WP_125364452.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus gordonii</i>	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_045772712.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	828	1093	98%	0.0	82.21%	WP_061590679.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus macacae</i>	825	919	99%	0.0	84.24%	WP_003079727.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus orisratti</i>	792	1236	99%	0.0	79.80%	WP_018375205.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus oralis</i>	787	1048	98%	0.0	78.21%	WP_045593440.1
	protein I/II V-region	<i>Streptococcus intermedius</i>	786	786	77%	0.0	99.22%	AAF20184.1
	protein I/II V-region	<i>Streptococcus constellatus</i>	784	784	77%	0.0	98.97%	AAF20183.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus sanguinis</i>	774	1039	98%	0.0	77.35%	WP_004193814.1
	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein	<i>Granulicatella adiacens</i>	769	819	98%	0.0	76.37%	WP_005605884.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus sobrinus</i>	766	1006	98%	0.0	76.83%	WP_019784233.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus downei</i>	761	1002	98%	0.0	76.63%	WP_002996622.1

3QE5 (C- Terminal Region)	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus intermedius</i>	932	932	96%	0.0	93.35%	WP_117283309.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus anginosus</i>	927	927	96%	0.0	92.14%	WP_143969960.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus macacae</i>	885	885	96%	0.0	87.90%	WP_003079727.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus orisratti</i>	816	816	96%	0.0	81.85%	WP_018375205.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus sobrinus</i>	812	812	96%	0.0	76.81%	WP_019771067.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus downei</i>	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_002996622.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus criceti</i>	798	798	96%	0.0	76.21%	WP_004225946.1
	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein	<i>Granulicatella adiacens</i>	764	764	96%	0.0	78.23%	WP_005605884.1
	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin	<i>Streptococcus sanguinis</i>	743	743	96%	0.0	70.77%	WP_125377155.1

De igual manera cuando se utilizó la base de datos con secuencias de proteínas específicas para bacterias de la cavidad oral las secuencias homólogas principalmente fueron con el receptor de aglutinina, 11 secuencias, y 13 secuencias fueron del Ag I/II o Pac (Tabla 4). Además, se encontró que las secuencias homólogas para 3IPK - 3QE5, eran de las mismas seis bacterias *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. downei*, *S. sanguinis*, *Granulicatella adiacens* y *S. gordonii*, pero para el fragmento 3IPK se encontraron homologías con secuencias de proteínas de otras bacterias como de *Parvimonas micra*, *Cryptobacterium curtum*, *Mogibacterium timidum*, *Atopobium parvulum* y *Abiotrophia defectiva* y para el fragmento 3QE5 las homologías incluyen proteínas de *S. oralis*, *S. sinensis*, *S. agalactiae*, *S. vestibularis*, *S. sobrinus* y *S. anginosus* (Tabla 4).

Tabla 4. Datos búsqueda de homología con secuencias bacterias de cavidad oral. Descripción de las secuencias de aminoácidos que produce alineaciones significativas con 3IPK y 3QE5 utilizando la búsqueda BLAST-P (HOMD) limitada a bacterias orales. El nombre de las bacterias resaltado en rojo representa a aquellas que se encuentran en un solo de los fragmentos 3IPK o 3QE5.

Agl/II fragment	Protein	Description	Max Score	Per. Ident	E value
3IPK (A3VP1 Region)	Cell surface antigen I/II	<i>Streptococcus mutans</i>	838	86	0.0
	Major cell-surface adhesin PAc	<i>Streptococcus intermedius</i>	770	83	0.0
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus oralis</i>	682	78	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Streptococcus downei</i>	665	78	0.0
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus sanguinis</i>	659	77	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Granulicatella adiacens</i>	658	76	0.0
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus gordonii</i>	644	76	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Parvimonas micra</i>	451	68	1E-125
	Agglutinin receptor	<i>Cryptobacterium curtum</i>	165	45	5E-39
	Agglutinin receptor	<i>Mogibacterium timidum</i>	154	46	6E-36
	Agglutinin receptor	<i>Atopobium parvulum</i>	150	43	1E-34
Agglutinin receptor	<i>Abiotrophia defectiva</i>	147	42	8E-34	
3QE5 (C- Terminal Region)	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Streptococcus mutans</i>	862	88	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Streptococcus intermedius</i>	816	86	0.0
	Cell surface antigen I/II	<i>Streptococcus anginosus</i>	750	83	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Granulicatella adiacens</i>	689	77	0.0
	Major cell-surface adhesin Pac	<i>Streptococcus downei</i>	688	77	0.0
	Major cell-surface adhesin PAc	<i>Streptococcus sobrinus</i>	688	78	0.0
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus sanguinis</i>	629	74	1E-178
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus gordonii</i>	624	73	1E-177
	Cell surface antigen I/II	<i>Streptococcus oralis</i>	622	73	1E-177
	Cell surface antigen I/II	<i>Streptococcus sinensis</i>	333	52	8E-90
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus agalactiae</i>	329	61	2E-88
	Agglutinin receptor	<i>Streptococcus vestibularis</i>	327	60	7E-88

En el análisis de similitud de estructura de proteínas se encontraron 3 coincidencias para cada fragmento 3IPK y 3QE5, 2 correspondientes a las cadenas A y B de cada uno 3ipkA, 3ipkB y 3qe5A, 3qe5B, respectivamente. La otra secuencia coincidente para 3IPK fue 3ioxA, una

secuencia de la misma región A3VP1 de *S. mutans* AgI / II, y para 3QE5 fue 4tshA que es un complejo de interacción N-terminal y C-terminal de Ag I / II (tabla 5).

Tabla 5. Datos búsqueda de homología estructural. Resultados de la búsqueda de homologías estructurales para 3IPK y 3QE5 con el programa FATCAT. Los datos corresponden solo a resultados con un P-valor < 0,05.

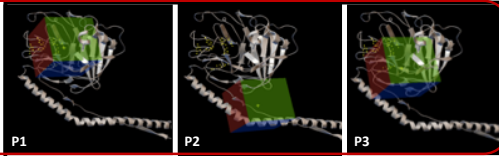
Query	Structure	length	score	P-value	twist	opt-len	opt-rmsd	chain-rmsd	align-len	gap	seq-ide(%)
3IPK	3ipkA	489	1464.00	0.00e+00	0	489	0.00	0.00	489	0	100.00
	3ioxA	489	1450.65	0.00e+00	0	489	0.64	0.63	489	0	100.00
	3ipkB	489	1448.24	0.00e+00	0	489	1.60	1.60	489	0	100.00
3QE5	3qe5A	487	1440.00	0.00e+00	0	487	0.00	0.00	487	0	100.00
	3qe5B	487	1436.40	0.00e+00	0	487	0.59	0.57	487	0	100.00
	4tshB	485	1358.85	0.00e+00	0	464	0.64	0.64	486	22	95.47

4.2 Selección de sitios de unión de ligando

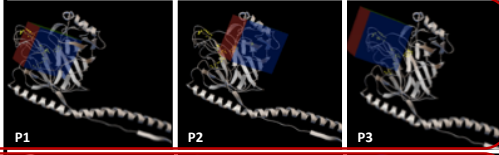
Para cada una de las proteínas 3IPK y 3QE5 se definieron 6 sitios de unión a ligando ya que se usaron dos programas para la predicción de estos “*pockets*” y cada programa por defecto selecciona los tres mejores sitios para cada proteína. En el caso de la proteína 3IPK el mejor sitio para la unión de ligandos establecido por el programa Metapocket se encontraba en las coordenadas X= 7,739, Y= 37,581 y Z= 26,828 con pequeñas diferencias en comparación con el *pocket* definido por el programa COACH X= 8,442, Y= 42,402 y 30,522, diferencias que se visualizaron al delimitar las coordenadas sobre la proteína y donde se observó una mayor diferencia en la ubicación de los segundos *pockets* definidos por los programas (Figura 3-A y 3-B). Para la proteína 3QE5, los mejores sitios para la unión de ligandos (*Pockets* 1 = P1) establecidos por los programas Metapocket y COACH, tuvieron la mayor diferencia en cuanto a

ubicación X= 26,775, Y= 35,391 y Z= 81,221 y X= 69,690 Y= 53,887 y 128,439 (Figura 3-C y 3-D).

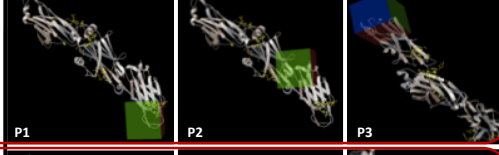
A						
PREDICTOR	PROTEIN FRAGMENT	POCKET	COORDINATES			Z-SCORE
			X	Y	Z	
MetaPocket	3IPK	1	7.739	37.581	26.828	16.97
		2	26.182	63.410	1.527	4.35
		3	8.756	41.334	17.724	1.63



B						
PREDICTOR	PROTEIN FRAGMENT	POCKET	COORDINATES			C-SCORE
			X	Y	Z	
COACH	3IPK	1	8.442	42.402	30.522	0.375
		2	16.431	32.680	14.360	0.051
		3	-5.605	37.483	28.032	0.051



C						
PREDICTOR	PROTEIN FRAGMENT	POCKET	COORDINATES			Z-SCORE
			X	Y	Z	
MetaPocket	3QE5	1	26.775	35.391	81.221	13.69
		2	35.450	42.813	114.619	5.86
		3	101.525	56.924	161.536	5.64



D						
PREDICTOR	PROTEIN FRAGMENT	POCKET	COORDINATES			C-SCORE
			X	Y	Z	
COACH	3QE5	1	69.690	53.887	128.439	0.21
		2	55.817	51.819	112.584	0.20
		3	72.663	44.614	148.421	0.19

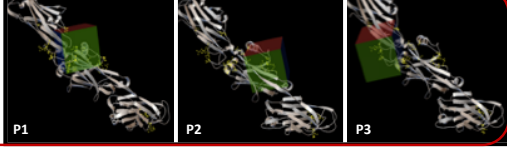


Figura 6. Datos de coordenadas y esquema de ubicación de sitios de unión. Datos de las coordenadas en los ejes X, Y y Z para 3 sitios de unión a ligando delimitados en las tres imágenes (P1,P2,P3) de la estructura proteica, con la caja de colores verde, azul y rojo (Preparada en AutoDockTools); establecidos para 3IPK por el programa Metapocket (A) y COACH (B) y para 3QE5 por Metapocket (C) y COACH (D).

4.3 Acoplamiento molecular y selección de compuestos

En total se realizaron 36 acoplamientos moleculares, debido a que se seleccionaron dos proteínas, 3IPK y 3QE5 y para cada una de ellas se obtuvieron 6 sitios de unión o pockets, para la búsqueda de compuestos en 3 librerías. Cada acoplamiento, a partir de la TACC con el autodock vina, por defecto arrojó 1000 compuestos, para un total de 36.000 compuestos. Para filtrar todos

esos compuestos, se utilizaron dos métodos, uno basado en los mejores valores de acoplamiento y el otro en los compuestos con mayor número de pockets con los que interactuó; de cada método se seleccionaron los mejores 10 compuestos, para un total de 20 compuestos. Sin embargo, se encontró que el compuesto ZINC19924906 de la librería “Small”, fue seleccionado por ambas características. El compuesto ZINC68568370 de la librería de compuestos naturales fue el que presentó el mejor de energía de interacción -12,8; por el contrario, de acuerdo a compuestos que interactuaron en un mayor número de pockets, los 10 seleccionados son de la librería Small y se acoplaron a los 12 pockets utilizados para los acoplamientos, es decir que tienen afinidad para ambas proteínas (Tabla 6)(38).

Tabla 6. Datos de re-acoplamiento local de los compuestos seleccionados. Resultados de energía de interacción obtenidos del re-acoplamiento con una exhaustividad de 20, para la interacción de las proteínas 3IPK y 3QE5 con los compuestos seleccionados, librerías de las cuales se obtuvieron y número de *pockets* con en los que se encontró cada compuesto. El compuesto resaltado en negro fue el único compuesto que además de interactuar en todos los sitios de interacción en ambas proteínas 3IPK y 3QE5, lo hizo con una alta afinidad. COA: programa COACH. MET: programa Metapocket 2.0. Los valores resaltados con un fondo azul claro representan los valores de energía de interacción más bajos (lo que indica interacciones con mayor afinidad).

NUMERO DE POCKETS CON LOS QUE INTERACCIONÓ EL COMPUESTO	COMPUESTOS	LIBRERÍA	3IPK						3QE5					
			P1		P2		P3		P1		P2		P3	
			COA	MET	COA	MET	COA	MET	COA	MET	CO A	MET	CO A	MET
No aplica	ZINC68568370	NAT	-12,8	-12,8	-7,5	-9	-9,4	-10,9	-8,5	-8,8	-8,1	-8,9	-7,1	-7,7
	ZINC70669788	NAT	-11,4	-12,8	-7,5	-8,4	-8,7	-10,1	-7,9	-8,7	-7,7	-7,6	-7,6	-6,5
	ZINC70669789	NAT	-11,5	-12,7	-7,3	-8,3	-8,8	-9,8	-8,1	-9	-7,9	-7,8	-7,8	-6,3
	ZINC34257514	NAT	-12,6	-12,6	-6,7	-8,8	-7,7	-9,8	-6,9	-8,7	-6,8	-7,6	-6,7	-7,6
	ZINC04817561	NAT	-10,3	-12,4	-10,1	-8,3	-8,6	-12,4	-7,2	-9,2	-7,1	-7,9	-7,2	-7
	ZINC67912808	NAT	-12,3	-12,5	-8,2	-8,8	-8,4	-9,1	-7,6	-9,5	-7,6	-8,1	-7,1	-6,8
	ZINC70686498	NAT	-12,2	-12,2	-7,8	-8,2	-8	-9,9	-7,4	-8,1	-7,3	-9,6	-6,6	-7,1
	ZINC04015296	NAT	-11,7	-11,6	-8,4	-9,8	-9	-11,7	-9,3	-11,4	-7,5	-9,3	-7,4	-9,8
	ZINC08594547	LRG	-11,6	-11,7	-7,7	-8,5	-8,1	-11,4	-7,6	-8,6	-7,1	-8,2	-6,5	-8,3
	ZINC00970517	SM	-9,4	-9,4	-9	-8,2	-7	-9	-6,7	-7,7	-6,3	-7,5	-5,9	-7,3
	ZINC01033612	SM	-9,3	-9,5	-8,7	-7,7	-7,3	-9,4	-7,4	-7,8	-7	-8,1	-7,4	-7,5
	ZINC08647964	SM	-9,7	-9,8	-9,4	-7,9	-7,4	-10,4	-6,9	-8,4	-6,8	-8,7	-6,2	-7,5
	ZINC12369546	SM	-9,5	-10	-9,1	-8,3	-7,5	-9,8	-7,9	-8,3	-6,7	-7,8	-6,8	-8,5
	ZINC19924906	SM	-11,1	-11	-7,2	-8,2	-7,1	-9,2	-6,9	-8,3	-6,7	-7,5	-6,8	-7,5
	ZINC03120327	SM	-9,6	-9,7	-10,1	-7,9	-7,1	-10,1	-6,7	-8	-7,1	-8	-6,9	-8,5
	ZINC19835160	SM	-10,3	-9,5	-6,9	-8,7	-7,7	-9,7	-6,6	-8,4	-6,7	-8	-5,8	-6,9
	ZINC19835187	SM	-10,7	-10,7	-9,2	-8,8	-8,5	-10,3	-8,1	-8,7	-7,5	-8,4	-6,9	-8,8
	ZINC19924939	SM	-10,4	-10,4	-9	-8,9	-7,2	-8,1	-7,6	-7,5	-7,1	-8	-6,4	-7,9
	ZINC59608258	SM	-9,4	-10,1	-7,8	-7,9	-7,2	-8,9	-6,8	-7,7	-6,1	-7,6	-6,3	-6,7

4.4 Predicción *in silico* de propiedades ADME de los compuestos seleccionados

A los 19 compuestos seleccionados se les calcularon las propiedades ADME, teniendo en cuenta 13 parámetros farmacocinéticos y de acuerdo con lo establecido para esta investigación se encontró que ninguno de los compuestos presentó más de 2 violaciones a las reglas de Lipinski ni tuvieron más de dos parámetros cuyos valores estuvieran por fuera de los rangos establecidos. Particularmente, el peso molecular de todos los compuestos tuvo un rango entre 312,4 y 634,2 y en relación a las reglas de Lipinski 10 de ellos no presentaron ninguna violación, 3 presentaron una violación y 6 compuestos 2 violaciones (tabla 7).

Tabla 7. Datos de parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos predictivos. Resultado de los parámetros fisicoquímicos y los perfiles farmacocinéticos predictivos, de los compuestos seleccionados. Calculados en la aplicación QuikProp versión 3.2, del software Schrödinger. Los datos resaltados en rojo indican valores fuera del rango establecidos para el parámetro. Pka (Calculado en el software Marvin de ChemAxon).

	PM	Total SASA	No. enlaces rotables	Dona P-H	Acept P-H	QP log P for octano /agua	Permeabilidad Caco-2 P (nm/sec)	Permeabilidad MDCK (nm/sec)	QP log Kp para la permeabilidad de la piel	Violaciones R5 - Lipinski	% Human Oral Absor GI (+20%)	Qual. Modelo para absorción oral humana	Pka
Compound code	(130.0 / 725.0)	(300.0 /1000.0)	(0.0 /15.0)	(0.0/6.0)	(2.0 /20.0)	(-2.0 / 6.5)	(<25 poor, >500 great)	(<25 poor, >500 great)	(Kp in cm/hr)	(maximum is 4)	(<25% is poor)	(>80% is high)	
ZINC68568370	504,6	790,9	10,0	0,0	0,0	11,4	9906,0	5899,0	2,2	2,0	100,0	low	Sin grupos ionizables
ZINC70669788	605,0	935,2	4,0	2,0	5,4	7,9	1180,0	591,0	-2931,0	2,0	100,0	low	(-0,58) - (-1,19)
ZINC70669789	605,0	925,7	4,0	2,0	5,4	7,9	1256,0	633,0	-2878,0	2,0	100,0	low	(-0,58) - (-1,19)
ZINC34257514	509,6	807,8	3,0	0,0	4,5	6,4	564,0	266,0	-3,0	2,0	88,0	low	Sin grupos ionizables
ZINC04817561	522,6	788,6	2,0	0,0	7,0	5,4	2447,0	1301,0	-2,2	2,0	93,0	low	(9,32)-(3,93) - (3,32)
ZINC67912808	634,2	767,7	2,0	3,0	8,0	5,8	3052,0	3542,0	-2035,0	2,0	100,0	low	(15,05) - (13,69) - (13,69)
ZINC70686498	554,7	873,0	2,0	1,0	8,0	4,7	203,0	247,0	-2,7	1,0	83,0	high	(15,17) - (8,5)
ZINC04015296	493,5	750,7	0,0	0,0	9,0	3,3	243,0	107,0	-2,6	0,0	89,0	high	(-1,31)
ZINC08594547	478,6	807,0	3,0	1,0	8,5	4,3	341,0	154,0	-2,7	0,0	100,0	low	(12,41) - (4,05)

ZINC00970517	312,4	521,6	0,0	0,0	1,5	4,9	9906,0	5899,0	0,1	0,0	100,0	low	Sin grupos ionizables
ZINC01033612	406,8	692,1	5,0	0,5	5,5	4,4	511,0	590,0	-1972,0	0,0	100,0	low	(12,35) - (9,77) - (2,31)
ZINC08647964	419,4	656,7	4,0	0,0	7,5	2,5	101,0	41,0	-3,5	0,0	77,0	high	(8,92) - (3,82)
ZINC12369546	451,3	709,0	2,0	0,0	4,5	6,0	1918,0	10000,0	-1,4	1,0	100,0	low	Sin grupos ionizables
ZINC19924906	453,6	774,9	1,0	0,0	9,0	3,4	391,0	270,0	-3,4	0,0	93,0	high	(6,6) - (0,32) - (-1,91)
ZINC03120327	393,5	678,2	3,0	0,0	4,0	5,3	1895,0	1410,0	-0,7	1,0	100,0	low	(-0,82)
ZINC19835160	464,6	775,2	2,0	0,0	6,8	4,9	772,0	413,0	-2,8	0,0	100,0	high	(7,11) - (0,89)
ZINC19835187	479,6	746,5	1,0	0,0	7,3	4,8	961,0	883,0	-2,8	0,0	100,0	high	(6,98) - (-0,78)
ZINC19924939	470,6	671,3	2,0	0,0	7,5	3,7	378,0	191,0	-3,4	0,0	95,0	high	(6,35) - (0,27)
ZINC59608258	494,4	737,3	6,0	2,5	5,5	4,7	185,0	698,0	-4,1	0,0	95,0	high	(14,17) - (0,35) - (-1,18)

4.5 Predicción computacional de toxicidad de los compuestos.

Un análisis adicional a las propiedades ADME y a las reglas de Lipinski, fue la evaluación predictiva de las probabilidades de citotoxicidad de los compuestos para lo cual se utilizó como referencia la Clorhexidina, uno de los antimicrobianos usado con mayor frecuencia en cavidad oral y que tiene una dosis letal 50 (DL50) experimental de 1260 mg/kg (62). Para este estudio se calculó una DL50 de 1100 mg/kg, por tanto, es un compuesto de categoría IV (C-IV). En relación a los compuestos 1 (ZINC67912808) fue categorizado como C-II (DL50= 10mg/kg), el compuesto ZINC19924939, común en los dos sistemas de selección (mejor energía de acoplamiento y número de *pockets* de interacción), se clasificó como C-III con una DL50 de 184 mg/kg; 15 compuestos de acuerdo a sus DL50 fueron C-IV (ZINC70686498, ZINC04817561, ZINC04015296, ZINC08594547, ZINC70669788, ZINC70669789, ZINC68568370, ZINC19835160, ZINC19924906, ZINC03120327, ZINC01033612, ZINC19835187, ZINC59608258, ZINC12369546, ZINC08647964) y por último los compuestos ZINC00970517 y ZINC34257514

tuvieron clasificaciones C-V con una DL50 de 3550 y 3250 mg/kg, respectivamente (Figura 7). Compuestos C-VI no fueron encontrados en este estudio.

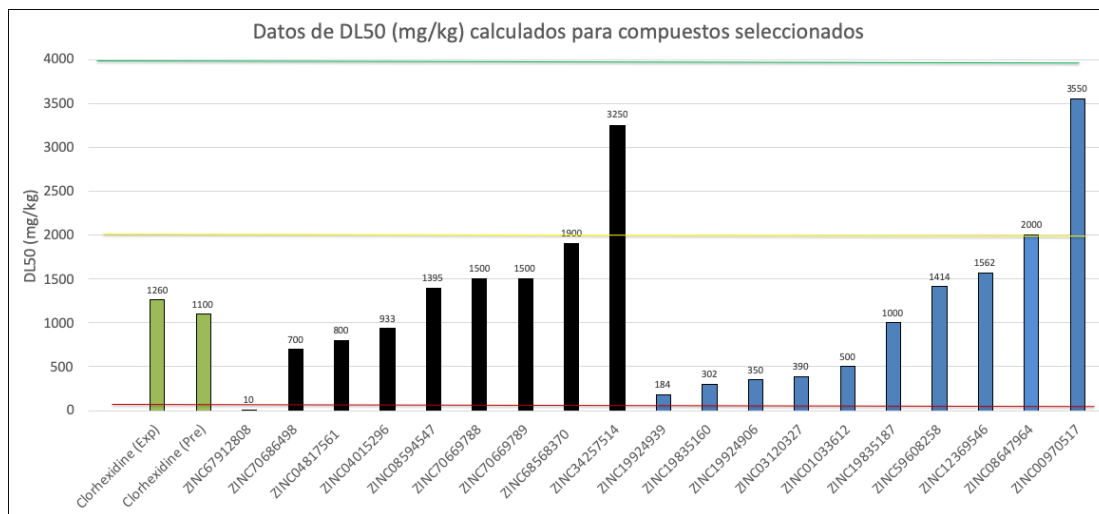


Figura 7. Datos de Ld50 (mg / kg) calculados para compuestos seleccionados. Se utilizó clorhexidina como referencia y se incluyen sus valores de DL50 experimentales y predictivos 1260 y 1100 (mg/kg). La línea roja representa el punto de referencia de DL50, basado en los datos experimentales de DL50 de la Clorhexida. Las barras verdes representan en compuesto de referencia, que para este caso fue la Clorhexidina, las barras negras representan los compuestos que fueron seleccionados de acuerdo con los valores de energías de interacción y las barras azules a los compuestos seleccionados de acuerdo al número de sitios de interacción en los que se acoplo. De acuerdo con la DL50, la línea roja establece el límite de los compuestos clasificados como probablemente fatales (Grupos I y II), la línea amarilla para compuestos probablemente tóxicos (Grupos III y IV) y la línea verde probablemente nocivos o no tóxicos (Grupos V y VI).

Adicionalmente, se analizó la probabilidad para los compuestos de presentar características de hepatotoxicidad, carcinogenicidad, inmunotoxicidad y mutagenicidad (Figura 5); 6 compuestos (ZINC67912808, ZINC68568370, ZINC04817561, ZINC03120327, ZINC19835160, ZINC59608258) presentaron por lo menos una de estas características, 7 compuestos presentaron

por lo menos 2 de estas características (ZINC70669788, ZINC70669789, ZINC08594547, ZINC01033612, ZINC12369546, ZINC34257514, ZINC00970517) y los compuestos ZINC04015296 y ZINC08647964 presentaron por los menos 3 características citotóxicas. Finalmente, se seleccionaron 4 compuestos ZINC19835187, ZINC19924939, ZINC70686498 y ZINC19924906 los cuales no presentaron ninguna probabilidad de características citotóxicas, al igual que la Clorhexidina (Figura 8) (Anexo 3). A continuación, se presentan los nombres IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) para los compuestos seleccionados para evaluación *in vitro* (Figura 9), después de los análisis *in silico*.

ZINC19835187 - (**ZI-187**): IUPAC Name = 1-[2-(2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl) -1,3-thiazole-4-carbonyl]-4-(9H-fluoren-9-yl) piperazine

ZINC19924939 - (**ZI-939**): 1-(9H-fluoren-9-yl)-4-[(5-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)sulfonyl]piperazine

ZINC19924906 - (**ZI-906**): IUPAC Name = 2-{5-[4-(9H-fluoren-9-yl) piperazine-1-carbonyl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}pyrazine

ZINC70686498 - (**ZI-498**): IUPAC Name = 1-benzyl-4-[(2R,8S) -2-(naphthalen-1-yl)-4,7-dioxo-3,6,17-triazatetracyclo[8.7.0.0.3,8.0.11,16] heptadeca -1(10),11,13,15-tetraen-6-yl]piperidin-1-ium

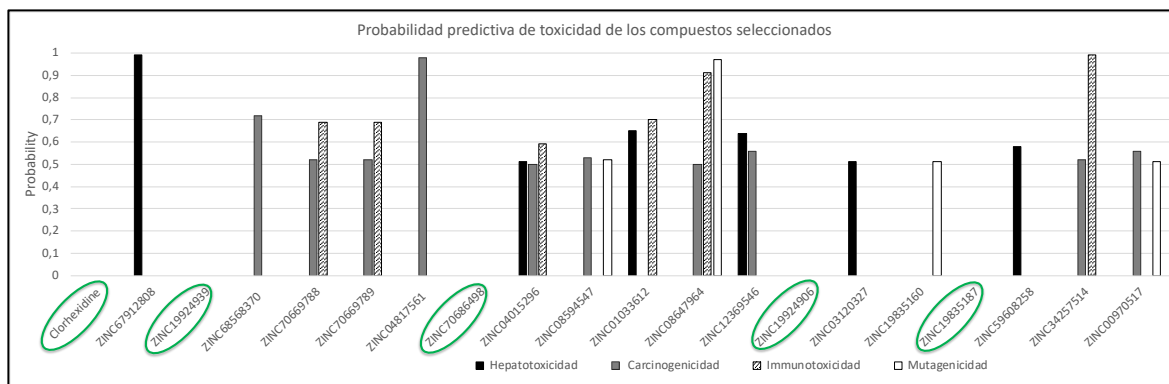


Figura 8. Datos de probabilidad predictiva de toxicidad de los compuestos seleccionados. Resultados de la probabilidad predictiva de toxicidad (Hepatotoxicidad - Carcinogenicidad - Immunotoxicidad - Mutagenicidad), de los compuestos seleccionados, calculada en el laboratorio virtual ProTox -II. Se incluyó en este análisis como referencia la clorhexidina, haciendo el mismo calculo.

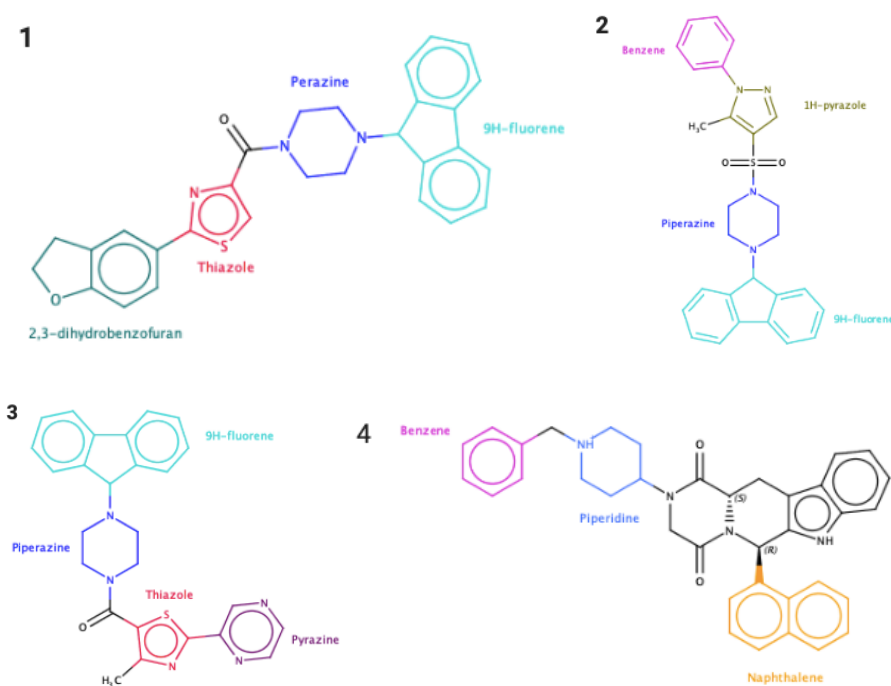


Figura 9. Estructuras de los compuestos seleccionados por análisis *in silico*. Estructuras de los compuestos seleccionados por análisis *in silico* con afinidad por el Ag I/II y potencial inhibitorio de la adhesión de *S. mutans*. Los grupos funcionales de estas estructuras se resaltan en diferentes colores y se describen en el texto. 1- ZI-187. 2- ZI-939. 3 - ZI- 906. ZI-498.

4.6 Análisis de tipo de interacción compuesto – proteína

Este análisis se realizó solo para 3 compuestos, no se tuvo en cuenta el compuesto ZI-498, debido a que no estaba disponible para la compra. De acuerdo a los complejos construidos entre cada compuesto con los dos ligandos, es decir con las proteínas 3IPK y 3QE5, se caracterizaron las posibilidades de presentar puentes de hidrogeno, en cada sitio de unión establecido por los dos predictores de *pockets*, además de describir la subestructura del compuesto y los residuos de aminoácidos de la proteína, en los que se dieron estos enlaces (Tabla 8). Para el compuesto ZI-187, se estableció que con ambas proteínas, 3IPK y 3QE5, se pueden presentar puentes de hidrogeno, en 5 *pockets* un solo puentes de hidrogeno y en 4 *pockets* de a 2 puentes de hidrogeno, los cuales se pueden dar entre el grupo *Thiazole* con los residuos *Lys 811-Thr 652 – Lys 621 – Ser 697* y el grupo *4-Carbonyl* con los residuos *Asn 820 - Thr 837*, específicamente en la proteína 3IPK; para la proteína 3QE5 el grupo *Thiazole* con los residuos *Lys 1030 - Arg 1197 – Lys 621*, el grupo *4-Carbonyl* con los residuos *Gly 321 - Arg 1221* y el grupo *2,3 – dihydro -1- benzofuran* con los residuos *Asn 1245 – Lys 1285* (Tabla 8).

Para el compuesto ZI-939, también puede presentar puentes de hidrogeno con ambas proteínas, 3IPK y 3QE5, sin embargo, con una menor frecuencia con relación al ZI-187, ya que tan solo 4 *pockets* pueden presentar puentes de hidrogeno y un *pocket* dos, los cuales se pueden dar entre el grupo *1H-pirazol* con los residuos *Ser 704 - Asn 590 - Thr 837* y el grupo *sulfonyl* con residuos *Thr 837*. Finalmente, para el compuesto ZI-906 *Lys 811-Thr 652 – Lys 621 –*

y el grupo 4-Carbonyl con los residuos *Asn* 820 - *Thr* 837, específicamente en la proteína 3IPK; para la proteína 3QE5 el grupo *Thiazole* con los residuos *Lys* 1030 - *Arg* 1197 – *Lys* 621, el grupo 4-Carbonyl con los residuos *Gly* 321 - *Arg* 1221 y el grupo 2,3 – dihydro -1- benzofuran con los residuos *Asn* 1245 – *Lys* 1285. Por último, los análisis predictivos de solubilidad mostraron que los 3 compuestos presentan una solubilidad baja (Tabla 9).

Tabla 8. Datos de interacciones de tipo puentes de hidrógenos. Caracterización de interacciones de tipo puentes de hidrógenos (enlace – H) entre los compuestos y los dos fragmentos proteicos 3ipk - 3qe5, en los sitios de unión “Pockets” establecidos por los dos programas Metapocket y COACH. Utilizando el software Chimera.

Compuesto	Proteína	Editor de Pockets	Pockets	Valores de energías (KJ/mol)	# H-Enlaces	Grupo del compuesto que interactúa en el H-enlace	Residuo de aminoácido que interactúa en el H-enlace	Distancia del enlace (Å)	
ZINC19835187	3IPK	COACH	1	-10,7	1	Thiazole	Lys 811	3.383	
		MET		-10,7	1	Thiazole	Lys 811	3.293	
		COACH	2	-9,2	2	4- carbonyl	Asn820	2.733	
		MET		-8,8	2	Thiazole	Thr 652	3.407	
		COACH		-8,5	0	4- carbonyl	THR 837	2.313	
		MET		-10,3	1	Thiazole	Lys 621	2.895	
	COACH	3	-8,1	2	Thiazole	SER 697	3.113		
	MET		-8,7	0	Thiazole	LYS 1023	2.559		
	3QE5	COACH	1	-8,1	2	4- carbonyl	GLY 321	2.308	
				MET	-8,7	0			
			2	-7,5	1	2,3-dihydro-1-benzofuran	Asn 1245	2.201	
				MET	-8,4	1	4- carbonyl	Arg 1221	2.162
		COACH	3	-6,9	2	2,3-dihydro-1-benzofuran	Lys 1285	2.272	
				MET	-8,8	0	Thiazole	Arg 1197	2.294
MET				-8,8	0				
				-10,4	1	1H-pyrazol	Ser 704	2.407	
ZINC19924939	3IPK	COACH	1	-10,4	1	1H-pyrazol	Ser 704	2.394	
		MET		-9	1	1H-pyrazol	Asn 590	2.748	
		COACH	2	-8,9	1	sulfonyl	Thr 837	1.990	
		MET		-7,2	0				
		COACH		-7,2	0				
		MET		-8,1	0				
	3QE5	COACH	1	-7,6	0				
				MET	-7,5	0			
			2	-7,1	0				
				MET	-8	0			
		COACH	3	-6,4	2	1H-pyrazol	Arg 1197	2.465	
				MET	-7,9	0	1H-pyrazol	Arg 1197	2.008
			MET		-7,9	0			
					-11,1	2	Pirazine	Lys 812	2.279
ZINC19924906	3IPK	COACH	1	-11,1	2	Thiazole	Ser 704	2.273	
		MET		-11	2	Pirazine	Lys 812	2.245	
		COACH	2	-7,1	0	Thiazole	Ser 704	2.281	
		MET		-8,2	2	Pirazine	Lys 621	2.298	
		COACH		-7,1	0	1-carbonyl	Thr 837	2.090	
		MET		-9,2	1	Thiazole	Ser 762	2	
	3QE5	COACH	1	-6,9	1	Pirazine	Ile 1157	2.239	
				MET	-8,3	0			
			2	-6,7	0				
				MET	-7,5	1	Pirazine	Arg 1221	2.446
		COACH	3	-6,8	1	Pirazine	Asn 1015	1.971	
				MET	-7,5	2	Pirazine	Tyr 1131	2.049
			MET		-7,5	2	Pirazine	Asn 1128	2.438
							Thiazole		

Tabla 9. Datos de cálculo de solubilidad de los compuestos seleccionados. Resultados del cálculo de solubilidad en agua para los compuestos seleccionados, utilizando un consenso de 3 métodos Log S (ESOL), Log S (Ali) y Log S (SILICOS-IT).

	Log S (ESOL).	Solubility mg/ml; mol/l	Solubility Class	Log S (Ali).	Solubility mg/ml; mol/l	Solubility Class	Log S (SILICOS-IT)	Solubility mg/ml; mol/l	Solubility Class	Final Solubility	Final Solubility Class
ZINC19924906	-5,05	4,02e-03; 8,87e-06	Moderately	-4,99	4,65e-03; 1,02e-05	Moderately	-8,13	3,35e-06; 7,40e-09	Poorly	-6,06	Moderately soluble
ZINC19835187	-6,26	2,63e-04; 5,48e-07	Poorly	-6,42	1,84e-04; 3,83e-07	Poorly	-8,75	8,49e-07; 1,77e-09	Poorly	-7,14	Poorly soluble
ZINC19924939	-5,61	1,16e-03; 2,46e-06	Moderately	-5,26	2,58e-03; 5,48e-06	Moderately	-7,95	5,28e-06; 1,12e-08	Poorly	-6,27	Moderately soluble

4.7 Ensayo de citotoxicidad y actividad antimicrobiana

Para confirmar la citotoxicidad de los compuestos se evaluó su efecto sobre el crecimiento de células de fibroblastos de ligamento periodontal y se evaluó su actividad antimicrobiana sobre la bacteria *Streptococcus mutans - Lt11 (UB579 WT)* y la levadura *Candida albicans NCPF 3179*. En estos ensayos se confirmaron que no existen diferencias significativas entre las células FLP tratadas durante 24 horas, con los compuestos ZI-187 (P-valor = 0,7372), ZI-939 (P-valor = 0,8) y ZI-906 (P-valor = 0,7964) a una concentración de 100 μ M (Figura 10), en comparación con las células sin tratamiento, por tanto, los compuestos no tienen efectos sobre el crecimiento de células FLP. Sin embargo, se observó que las células presentaban cambios de tamaño y granularidad.

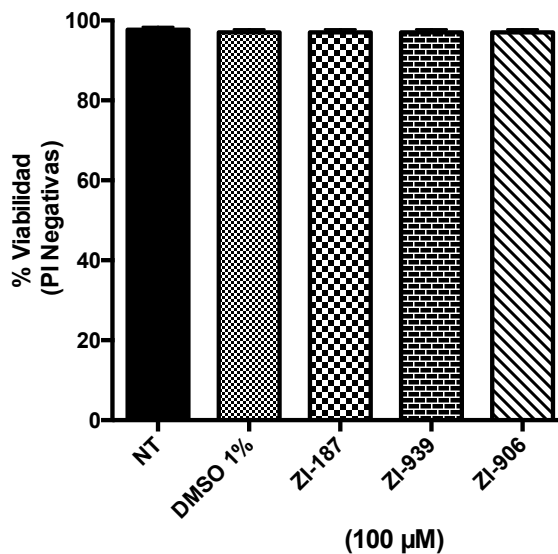


Figura 10. Ensayo de citotoxicidad sobre células de FLP. Porcentaje de viabilidad celular utilizando fibroblastos de ligamento periodontal (FLP) sin tratamiento NT, tratadas con **DMSO 1%** y tratadas con los compuestos **ZI-187**, **ZI-939** y **ZI-906** a una concentración de 100 µM, mediante citometría de flujo laminar con Yoduro de Propidio (IP)

Por otro lado, los compuestos en concentraciones entre 1000 - 100 - 10 µM co-cultivados con *S. mutans* LT-11, al igual que con *C. albicans* - NCPF 3179, no afectan su crecimiento, dado que no hay diferencias significativas entre los tratamiento y los microorganismos tratados con DMSO 10% (P-valor = < 0,001) (Figura 11) (Anexo 4 Y 5) .

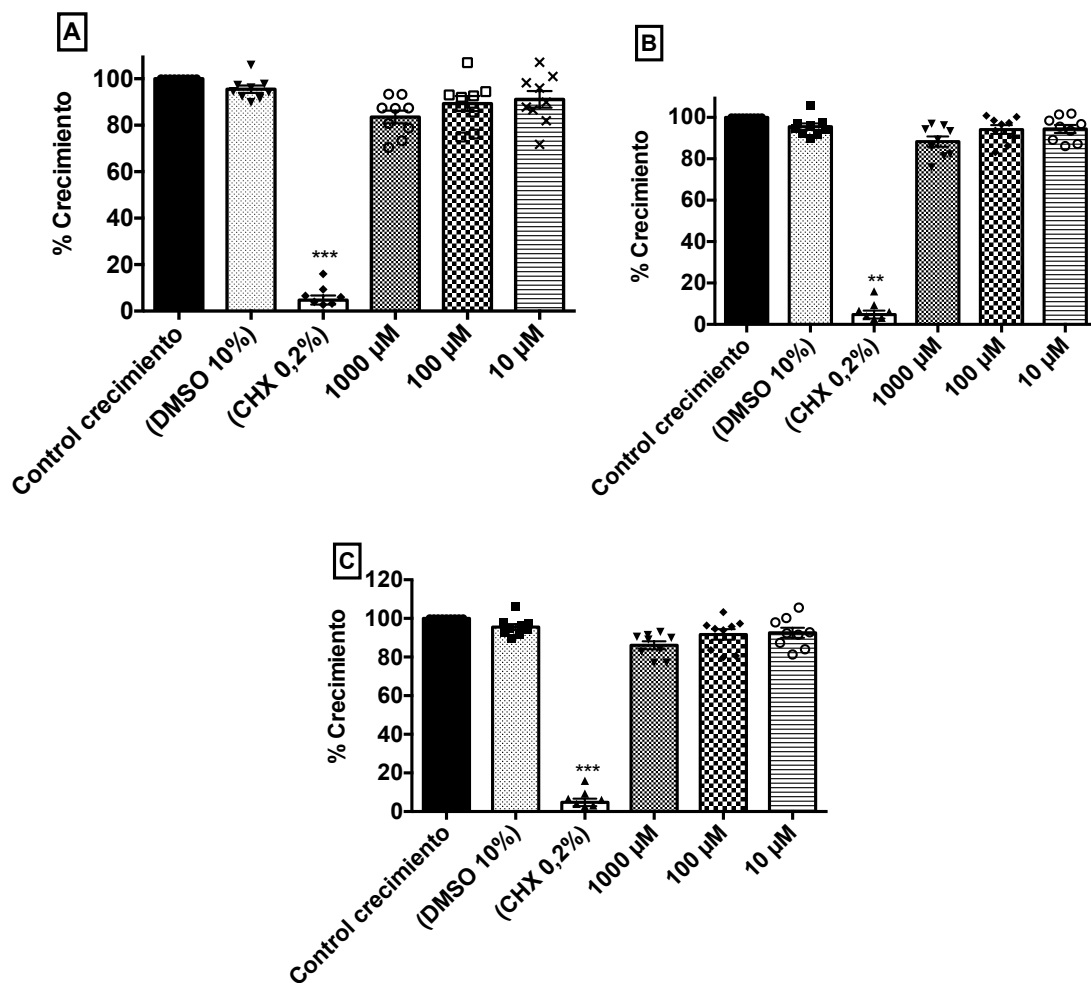


Figura 11. Ensayo de actividad antimicrobiana sobre *S. mutans – LT11*. Evaluación de actividad antimicrobiana de los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a concentraciones de 1000 -100 – 10 μ M, sobre el crecimiento de *S. mutans – LT11*, tratadas por 24 horas. Control de crecimiento (*S. mutans – LT11*), control del solvente (*S. mutans – LT11* en DMSO10%), Control de muerte (CHX: Clorhexidina 0,2%). Para este ensayo el OD (100%): 2,478 (SEM = 0,19) y P-valor= <0,001.

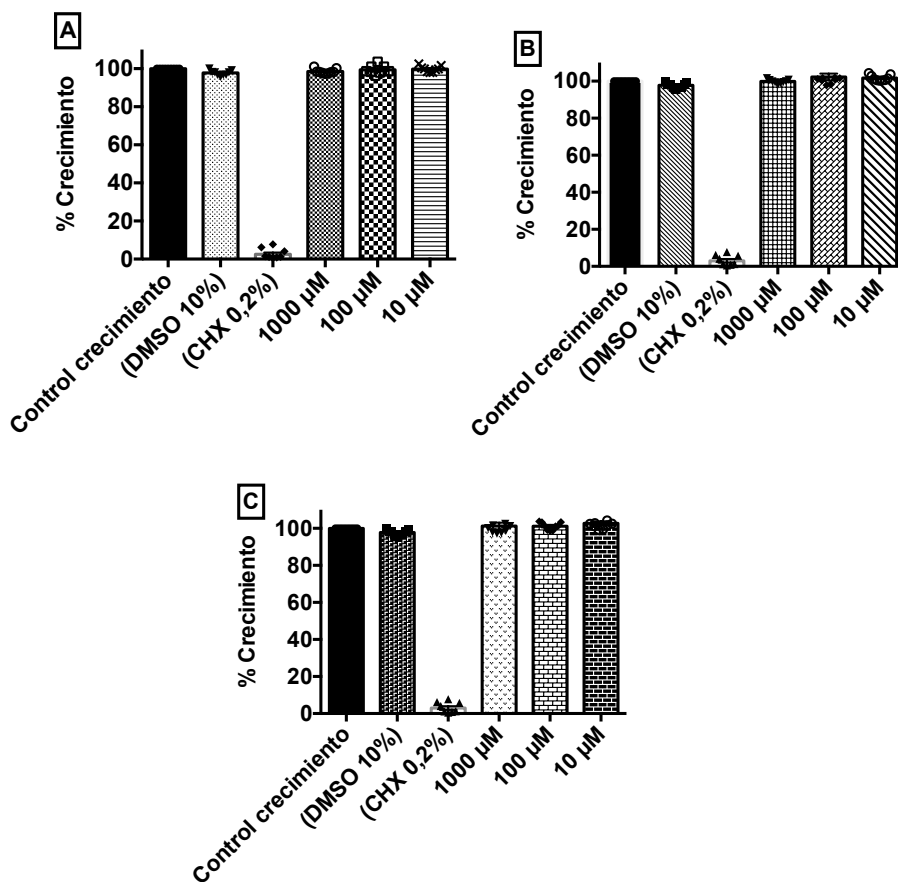
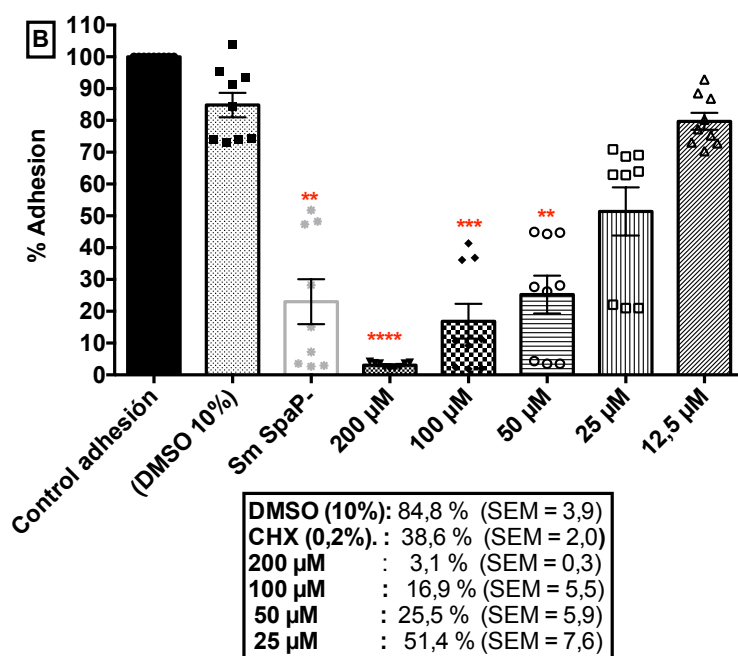
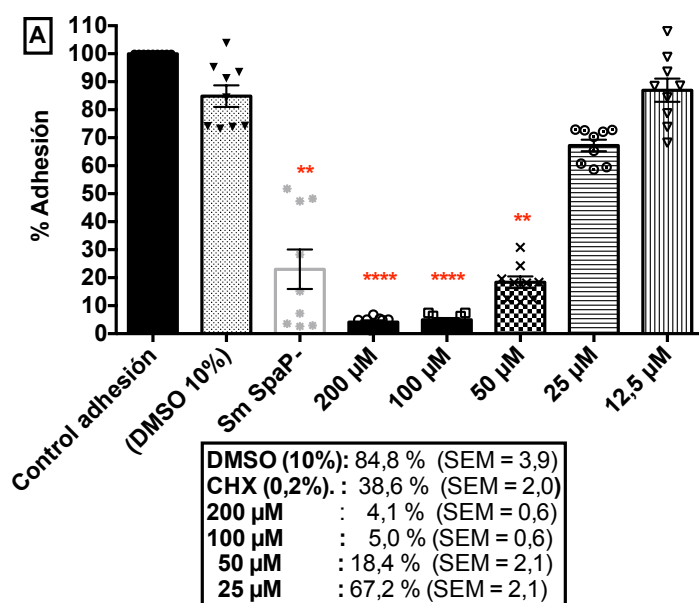


Figura 12. Ensayo de actividad antimicrobiana sobre *C. albicans* - NCPF 3179. Evaluación de actividad antimicrobiana de los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a concentraciones de 1000 - 100 - 10 µM, sobre el crecimiento de *C. albicans* - NCPF 3179, tratadas por 24 horas. Control de crecimiento (*C. albicans*), control del solvente (*C. albicans* en DMSO 10%), control de muerte (CHX: Clorhexidina 0,2%). Para este ensayo el OD (100%): 2,294 (SEM = 0,013) y P-valor= <0,001.

4.8 Ensayo de adhesión en *Streptococcus mutans* - Lt11 (UB579 WT)

Se estableció que al tratar por 3 horas *S. mutans* LT11 con los 3 compuestos evaluados inhibieron la adhesión de la siguiente manera, el compuesto ZI-187 a una concentración de 25 µM la inhibición fue del 32,8% (SEM= 2,1), a 50 µM fue del 81,6% (SEM= 2,1), a 100 µM fue del

95,0% (SEM= 0,6) y a 200 μ M fue del 95,9% (SEM= 0,6) (Figura 3-A), con un IC50 de 30,7 μ M (IC95% = 18,2 – 51,9) (Tabla 13).



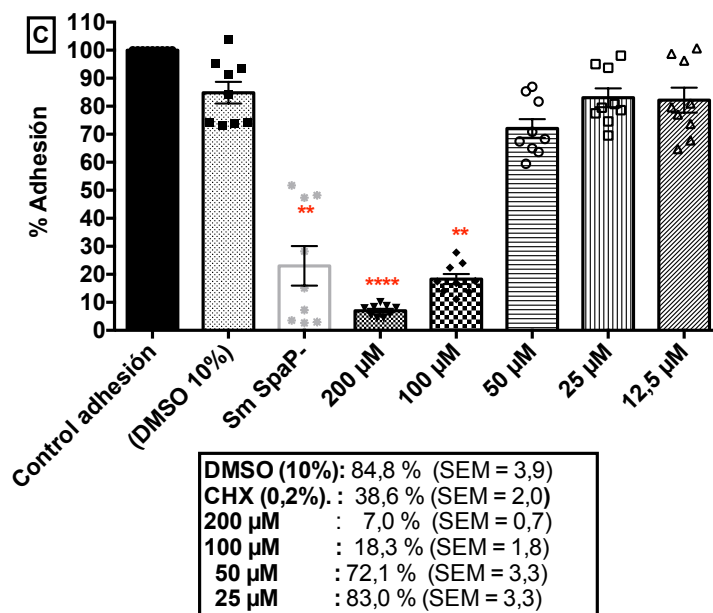


Figura 13. Ensayo de inhibición de adhesión de *S. mutans* – LT11. Gráfica de promedios y error estándar correspondiente a los datos del ensayo de adhesión de *S. mutans* – LT11 tratada con concentraciones 200 - 100 – 50 – 25 - 12,5 µM del compuesto ZI-187 (A), ZI-939 (B) y ZI-906 (C). Los asteriscos representan el nivel de significancia establecido por la diferencia obtenida del porcentaje de adhesión de los tratamientos, en comparación con el porcentaje de adhesión de *S. mutans* – LT11 en DMSO 10%.

Para ZI-939 a una concentración de 25 µM la inhibición fue del 48,6% (SEM = 7,6), a 50 µM fue del 74,5% (SEM = 5,9), a 100 µM fue del 83,1% (SEM = 5,5) y a 200 µM fue del 96,9% (SEM = 0,3) (Figura 3-B), con un IC₅₀ de 12,6 µM (IC_{95%} = 7,6 - 21,1) (Tabla 13) y para ZI-906 a una concentración de 25 µM la inhibición fue del 17% (ES = 3,3), a 50 µM fue del 27,9% (ES = 3,3), a 100 µM fue del 81,7% (ES = 1,8) y a 200 µM fue del 93% (ES = 0,7) (Figura 3-C), con un IC₅₀ de 78,6 µM (IC_{95%} = 43,2 - 143) (Tabla 13).

Tabla 10. Datos IC50 de los compuestos en inhibición de la adhesión de *S. mutans* – LT11. Resultados del IC50 obtenido para los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a concentraciones 200 - 100 – 50 – 25 - 12,5 μ M, en el ensayo de adhesión de *S. mutans* – LT11.

Compuestos	ZI-187	ZI-939	ZI-906
IC50 (μ M)	30,7	12,6	78,6
95% - CI	(18,2 – 51,9)	(7,6 - 21,1)	(43,2 - 143)

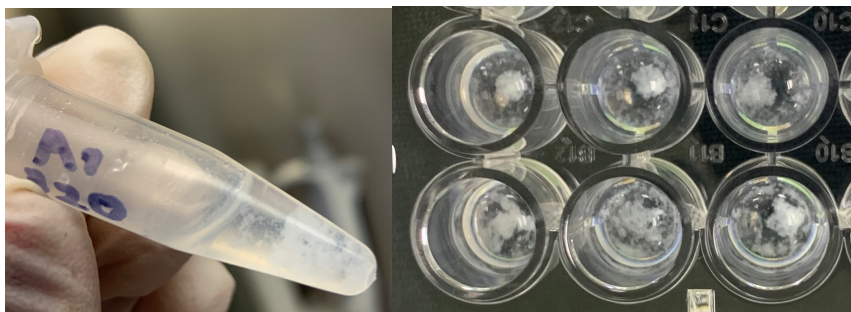


Figura 14. Registro fotográfico de Aglutinación de *S.mutans* - LT11 tratada con los compuestos. Registro fotográfico de la aglutinación generada a la bacteria *S.mutans* - LT11 en el momento en el que se le adiciona los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a las concentraciones donde se presentó inhibición de la adhesión.

Adicionalmente, se observó un fenómeno de aglutinación bacteriana al mezclar cada compuesto con las bacterias, solo en las concentraciones donde se afectó la inhibición (Figura 14). Dado que el compuesto ZI-187 fue el que presentó una mayor inhibición de la adhesión de *S. mutans*-LT11 y a una menor concentración, fue seleccionado para un análisis de microscopía electrónica de barrido (Figura 15), donde fue evidente la reducción del porcentaje de células bacterianas adheridas, respecto al control y se observaron algunas bacterias tratadas con 100 μ M

de ZI-187, logrando visualizar que las células tenían estructura celular intacta, formas redondas con bordes lisos.

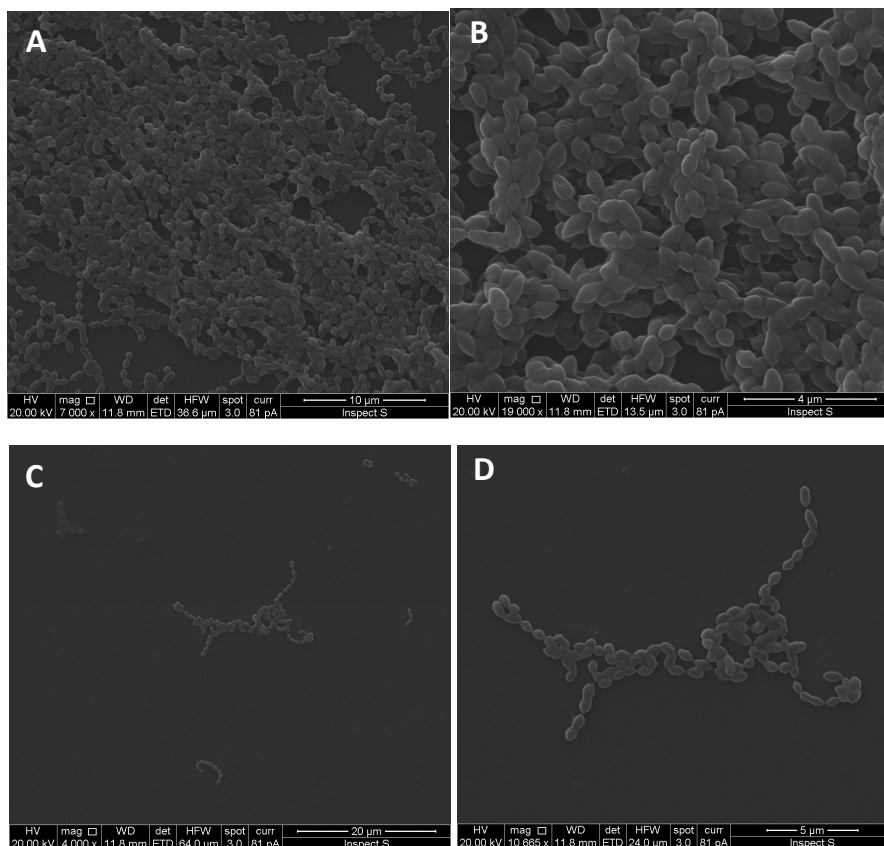


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de la adhesión de *S. mutans* – LT11. Microscopía electrónica de barrido de la adhesión de *S. mutans* – LT11 en solución salina por 3 horas, magnificación 7000x (A) y 19000x (B) y tratada con 100 μ M del compuesto ZI-187 por 3 horas, magnificación 4000x (C) y 11000x (D).

4.9 Simulación de dinámica molecular

Mediante simulación de dinámica molecular se estableció que el complejo 3ipk/ZI-187 alcanzó una alta estabilidad luego de 300ns, durante este tiempo la proteína 3IPK no tuvo cambios

fuerzas cuando se acopló con ZI-187 (Figura 16-A). De acuerdo con el resultado de RMSF, no se observó una fluctuación significativa de los residuos de aminoácidos, sin embargo, entre los residuos 550-600 y 800-850, se presentaron algunas diferencias en los picos del gráfico según la proteína 3IPK APO (negro) y el complejo (rojo) (Figura 16-B). Además, se observaron uno y dos puentes de hidrogeno entre el complejo durante el tiempo de simulación (Figura 16-C) y una constante estructura compacta de proteína en el complejo (Figura 16-D),

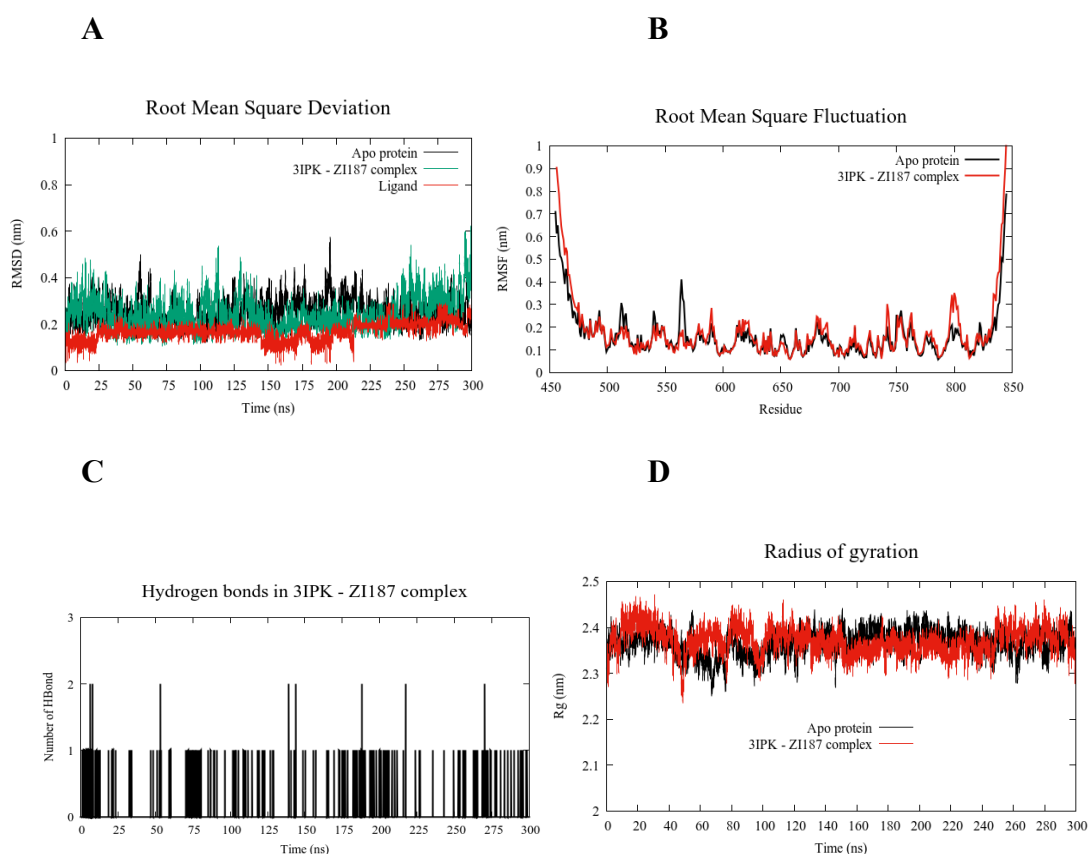


Figura 16. Gráficas de la simulación de dinámica molecular del complejo 3IPK/ZI-187. Resultados de los parámetros de la simulación de dinámica molecular para RMSD (Raíz de la desviación cuadrática media) (A), RMSF (Raíz de la fluctuación cuadrática media) (B), numero de puentes de hidrogeno (C) y radio de giro (compacta) (D), para la proteína APO – 3IPK y el complejo 3IPK/ZI-187.

CAPITULO V

4 DISCUSIÓN

La caries dental es una enfermedad muy prevalente en el hombre, tiene un carácter multifactorial y uno de esos factores es la parte microbiológica, en la que se conoce participan una gran cantidad de bacterias cariogénicas, siendo *S. mutans* la mas frecuente y las mas estudiada. Las terapias para la caries dental no son selectivas y tienen un amplio espectro lo cual compromete bacterias importantes para el mantenimiento de la salud oral. Bajo esta problemática se realizó una investigación con el objetivo de encontrar, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, compuestos que puedan ser selectivos para la adhesina Ag I/II de *S. mutans*, que no afecten otros microorganismos y que no presenten características citotóxicas.

En este sentido, para la proteína Ag I/II de *S. mutans* no se encontró una estructura cristalizada completa, quizás por su gran tamaño el cual varia alrededor de los 1.600 aminoácidos aproximadamente, entre los diferentes estreptococos (33), solo se encontraron 4 cristales de las cadenas A de diferentes regiones de esta proteína, denominados 3ipk.1.A que corresponde a la región A3VP1 y comprende los residuos de aminoácidos 392 a 870 (32), 3qe5.1.A que corresponde al dominio C-terminal e incluye los residuos 996 a 1482 (33), 1jmm.1.A que es la región V de los residuos 464 a 823 (79) y por ultimo el cristal 3opu.1.A de la región del dominio C-terminal de los residuos 1152 a 1489 (80). Sin embargo, para este estudio se seleccionaron únicamente los cristales de las cadenas A de las proteínas de la región A3VP1 (PDB: 3IPK) y la región C-terminal (PDB: 3QE5), debido la precisión esperada del modelo construido con la alineación y secuencia

de la proteína, el grado de natividad de las características estructurales observadas en el modelo en una escala global (QMEAN), cobertura de la proteína Ag I/II, por parte de los cristales de las proteínas 3IPK, la cual incluye casi en su totalidad los residuos de 1JMM y 3QE5 los residuos de 3OPU (figura X). Adicionalmente, es muy importante tener en cuenta que los cristales de las proteínas 3IPK y 3QE5, son fragmentos que desempeñan un papel muy importante en el proceso de adhesión de *S. mutans* al diente, ya que están ubicados en los extremos de la adhesina AgI/II están implicados en el reconocimiento del SAG humano (32).

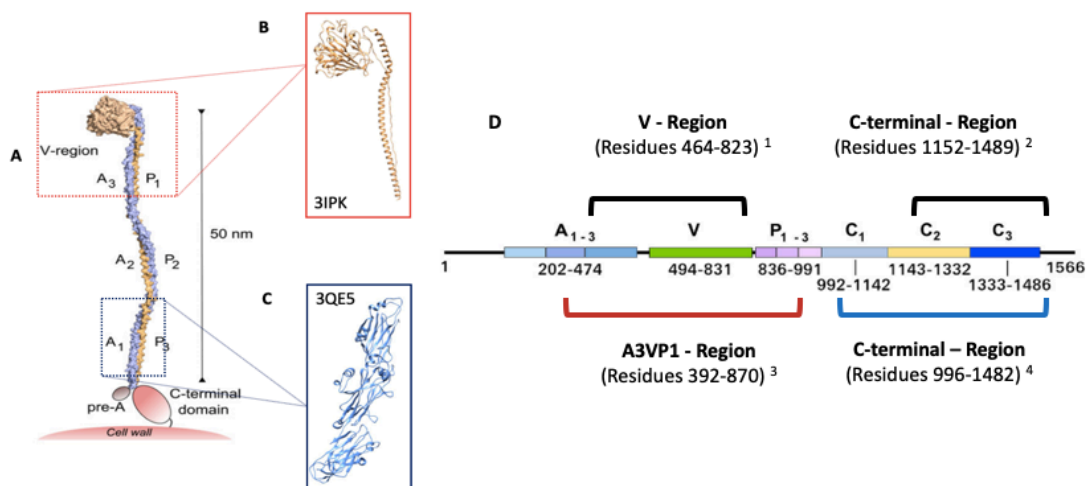


Figura 17. Cristales de las regiones de la proteína Ag I/II de *S. mutans*. **A.** Modelo de la estructura Ag I/II de *Streptococcus mutans* y la región de propuesta, de unión con la SAG humana, donde se producen interacciones tanto en el extremo distal a través de la región A3VP1 (3IPK), en un sitio de adherencia secundario mediado por el dominio C-terminal; tomado de (32). **B.** Estructura del cristal de la proteína de A3VP1 de Ag I/II PDB ID: 3IPK (32). **C.** Estructura del cristal de la proteína del extremo carboxilo terminal de Ag I/II PDB ID: 3QE5 (33). **D.** Gráfico modificado de (33) que representa la secuencia de la proteína Ag I/II (1566 aa) y la descripción de los residuos de aa que constituyen los cristales de las regiones de la proteína: Región V (PDB: 1JMM) (79)¹; dominio C-terminal (80)²; Región A3VP1 (PDB: 3IPK) (32)³ y la región C-terminal (PDB: 3QE5) (33)⁴.

En esta investigación se realizó un análisis de homología de secuencia y estructural de 3IPK y 3QE5, debido a que ambos cristales se utilizaron para la búsqueda y selección de compuestos con alta afinidad a estas proteínas, por ello es importante identificar otras proteínas que por ser similares a estas dos proteínas podrían afectarse con los compuestos seleccionados. Al realizar la búsqueda en la base de datos de proteínas humanas se encontraron pequeñas similitudes, con una proteína específica del espermatozoide que participa en la fertilización de mamíferos (81), la cadena A de enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) que participan en el mecanismo de degradación de proteínas por el sistema proteosoma (82), la cadena A de una ATPasa del retículo endoplásmico transicional que juega un papel esencial en la retrotranslocación de los sustratos modificados con ubiquitina desde el retículo endoplásmico al citosol a través del retículo endoplásmico (83) y finalmente, otra secuencia proteica de un correpresor que participa en la metilación y desmetilación del nucleosoma (84). Sin embargo, los datos obtenidos para estos alineamientos no fueron significativos, lo que podría indicar que los compuestos no presentarían efectos sobre proteínas humanas.

Por otro lado, al realizar el análisis de homología de secuencia con la base de datos de proteínas bacterianas, se encontraron homologías con proteínas de 23 especies bacterianas que en su mayoría son habitantes normales de cavidad oral, tracto gastrointestinal y genitourinario, pero que están asociadas a diversas patologías en el humano; dentro de ellas se encuentran bacterias como *Streptococcus troglodytae* que se encuentra en la cavidad oral del chimpancé (85,86), *Abiotrophia defectiva*, comensal oral asociado a endocarditis y aortitis (87); *Atopobium parvulum*, aislado particularmente del dorso de la lengua asociado a halitosis y sepsis bacteriana (88); *Cryptobacterium curtum*, patógeno oportunista asociado a enfermedad periodontal, inflamaciones

y abscesos de la cavidad oral (89); *Granulicatella adiacens* flora oral y gastrointestinal humana asociado a bacteremia; *Mogibacterium timidum*, asociado a periodontitis agresiva (90); *Parvimonas micra*, forma parte de la flora oral y gastrointestinal, asociado meningitis, artritis séptica, espondilodiscitis, endocarditis y abscesos cerebrales (91–93); *Streptococcus agalactiae*, catalogado como el mayor causante de muertes en neonatos, reconocido como un parásito emergente principalmente asociado a bacteriemias, infecciones de la piel, síndrome de choque tóxico, endocarditis (94).

También, se encontraron bacterias como *S. sanguinis* asociadas a enfermedad periodontal por interacción con otras bacterias (95) y *S. gornodii*, asociado a endocarditis (96). Por último, las secuencias en su mayoría pertenecen a un grupo grande de comensales bacterianos de cavidad oral, pero que pueden generar faringitis, bacteriemias, infecciones purulentas en el cuello y en órganos internos como el hígado y el cerebro y cáncer colonorectal, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus cricetid*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius* (97–101). Adicionalmente, las mayoría de las proteínas de estas bacterias, con las que se reportó alguna homología importante con 3IPK y 3QE5, fueron receptores de aglutininas y el Ag I/II que pertenecen al grupo de adhesinas bacterianas y generalmente son factores de virulencia importante para su capacidad patogénica (102–104).

En relación a los resultados de las homologías estructurales de 3IPK y 3QE5, estos permitieron verificar que no existía homología con alguna proteína humana o bacteriana diferente

a *S. mutans*, ya que las únicas proteínas con homologías estructurales fueron 3ioxA de la región A3VP1 (32) y 4tshA que es un complejo de interacción N-terminal y C-terminal (105), ambas del Ag I/II de *S. mutans*.

De acuerdo a lo anterior, se confirmó con las secuencias y las estructuras de las proteínas 3IPK y 3QE5, que al usar estos cristales como blanco para la selección de compuestos para la inhibición de la adhesión de *S. mutans*, dichos compuestos no fueran a presentar afinidad por proteínas humanas a través de las cuales se pudiera generar alguna citotoxicidad o afinidad por proteínas bacterianas que afectaran especies de importancia en la flora microbiana de la cavidad oral.

Después de definir estas dos proteínas, un paso fundamental para los estudios de búsqueda de compuestos basados en estructuras virtuales, es la selección de los sitios de unión de ligandos, es decir los sitios de la proteína en donde se direcciona el acoplamiento, ya que estos sitios deben tener unas características típicas como ser cóncavos, tener una variedad de donantes y aceptores de puentes de hidrógenos y características hidrofóbicas (106); de lo contrario pueden presentarse falsos negativos a la hora de seleccionar compuestos para ensayos *in vitro*, pues estos errores pueden presentarse cuando no se conocen sitios de unión en la proteína o cuando se usan modelos por homología, causando por ejemplo, que se seleccionen *pockets* de volúmenes pequeños que va a generar uniones o conformaciones incorrectas (107). Por esa razón, para esta investigación se utilizaron dos multiservidores o programas específicos para la selección de sitios de unión a ligando, que tienen algoritmos diferentes de selección, el MetaPocket usa un método de consenso basado en los sitios predichos de cuatro programas de acceso libre LIGSITEcs, PASS, Q-

SiteFinder y SURFNET, que se combinan para mejorar la tasa de éxito de la predicción y que está basada en la geometría y superficie de las proteínas (55), a diferencia del COACH que utiliza el consenso de dos métodos, uno basado en la comparación de subestructuras específicas de unión (TM-SITE) y otro en la alineación del perfil de secuencia (S-SITE), para predicciones de sitios de unión basados en proteínas conocidas (56) y al no encontrar un parámetro para definir cual de los dos predictores puede dar resultados mas precisos, se decidió utilizar ambos para la realización del *docking*.

Posterior a la búsqueda de los compuestos, el paso mas critico son los criterios para la selección final de los compuestos que se llevaran a la evaluación *in vitro*. Este aspecto es muy importante, ya que generalmente en los estudios computacionales de acoplamiento molecular se elijen los compuestos a través del puntaje de predicción de la mejor energía de interacción compuesto-ligando. Para el caso de *S. mutans*, se han reportado algunos estudios de docking molecular (28,38), utilizando la Gtf-C como proteína blanco, y se han propuesto algunos compuestos con actividad antibiofilm.

Sin embargo, se ha reportado que, además de utilizar los valores del acoplamiento, es necesario incluir otros análisis estructurales para la selección de los compuestos (108). Por lo anterior, en esta investigación se decidió establecer un protocolo de 10 pasos (Figura 10) para la búsqueda y selección de compuestos basados en estructuras virtuales, pretendiendo que dichos compuestos, además de tener alta afinidad a la proteína de interés, tengan las propiedades farmacocinéticas adecuadas, que sean seguros en relación a su citotoxicidad; siendo importante resaltar que aunque este protocolo fue estandarizado para la búsqueda de inhibidores de un agente

causal de caries dental, su utilidad tiene aplicabilidad sobre otros patógenos. Para lo anterior, se ha propuesto que a partir de la secuencia de la proteína de interés obtenida del *GenBank* (109), se utilice el programa de acceso libre Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>), un servidor de modelamiento de proteínas por homología de estructuras totalmente automatizado, con el cual se pueden buscar y seleccionar los cristales de proteínas que serán utilizados para el acoplamiento molecular. El siguiente paso es realizar una búsqueda de proteínas por homología de secuencia y estructural, para evaluar y verificar que los compuestos que se seleccionaran no interactúen con proteínas similares a la de interés y que generen problemas de citotoxicidad alteren otros organismos que no son de nuestro interés.

Además de este paso, como se mencionó con anterioridad, es muy importante la selección de los sitios de interacción molecular, en donde se dirigirá la búsqueda de los compuestos y para ello se sugiere apoyarse en programas de predicción de estos sitios de unión, teniendo en cuenta sus algoritmos, pues dado que es un paso crucial en los estudios computacionales de búsqueda de fármacos existen en la actualidad una gran diversidad de programas y estrategias para la selección de los sitios de interacción (110–112); para este estudio se seleccionaron 2 programas COACH y MetaPocket, descritos previamente, que tienen algoritmos y se basan en datos de otros programas. La búsqueda de compuestos se realizó con la librería ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>) utilizando el Centro de Computación Avanzada de Texas (TACC), pero en este paso el investigador puede elegir la librería de su preferencia, pues en los últimos años, la industria de proveedores de compuestos ha crecido para proporcionar el descubrimiento de fármacos con compuestos de detección y se estima que hay más de 16 millones de compuestos disponibles de estas fuentes (113).

Finalmente, debido a la gran cantidad de moléculas resultantes del acoplamiento, además de los valores de energía de interacción, se utilizaron otros análisis para definir los compuestos seleccionados para la experimentación *in vitro*; por ejemplo, el número de sitios de interacción que tuvo cada compuesto, las propiedades farmacocinéticas (ADME), predicciones de citotoxicidad y verificación del establecimiento de enlaces de hidrogeno entre el complejo compuesto – ligando. En este sentido se ha establecido que la fallas en el desarrollo de fármacos (40%) se presentan por problemas en propiedades ADME (114), por ello el análisis de propiedades ADME minimiza costos en la búsqueda y selección de fármacos, pues la viabilidad de los fármacos depende de la interacción con los sistemas biológicos, lo cual afecta la biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas (115). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que a pesar de que los estudios preclínicos de propiedades ADME ayudan a la reducción de fallas en la farmacocinética, no se puede olvidar que la toxicidad del fármaco sigue siendo un problema (116,117). Por esta razón, para esta investigación se seleccionaron dos programas que permitieran analizar estos dos aspectos, propiedades ADME y citotoxicidad, para el calculo de propiedades ADME se utilizó un programa licenciado que proporciona rangos para comparar las propiedades de una molécula en particular con las del 95% de los medicamentos conocidos (59) y el programa en línea ProTox-II usa la similitud molecular, farmacóforos y modelos de aprendizaje automático para la predicción de varios criterios de valoración de toxicidad; tales como toxicidad aguda, hepatotoxicidad, citotoxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, inmunotoxicidad, los cuales se basan en datos de ensayos *in vitro* e *in vivo*, tomando una estructura química bidimensional como entrada e informando el posible perfil de toxicidad de la sustancia química soportado en 33 modelos de predicción (61). Con el apoyo de estos dos programas se espera que los compuestos obtenidos

tengan unas propiedades farmacológicas óptimas y que presenten una baja o no presenten características citotóxicas, lo cual se pudo comprobar en este trabajo en células de ligamento periodontal. Sin embargo, es claro que se necesita complementar estos resultados en otras líneas celulares y lo más importante en modelos *in vivo*.

Muchas de las investigaciones que tienen como propósito inhibir la formación de biopelículas dentales, reportan compuestos o moléculas con actividades antimicrobianas (73,118–120), algo que puede ser crítico para la cavidad oral, debido que compuestos con esta actividad generalmente no son selectivos, por tanto, además de matar bacterias cariogénicas, pueden terminar con bacterias importantes para el mantenimiento de la salud oral (121) y aunque muchas bacterias están asociadas a patologías en humanos, también existen otras que tienen efectos positivos, como *S. dentisani*, una bacteria recientemente descrita y que parece estar asociada a personas que no han tenido experiencias de caries (122).

Por lo anterior, en los últimos años se buscan compuestos que puedan atacar selectivamente a *S. mutans* sin afectar otros microorganismos orales importantes, lo que podría lograrse con estrategias de búsqueda virtual de compuestos y que ha sido corroborado con compuestos que parecen tener selectividad por Gtfs de *S. mutans* sin afectar otras bacterias (28,38); este fue uno de los propósitos de la presente investigación, en donde se buscaban compuestos selectivos para el Ag I/II, una adhesina que está presente en muchas bacterias asociadas a patologías y aunque no se realizaron ensayos en otras especies bacterianas diferentes a *S. mutans*, solo se usó esta bacteria y la levadura *C. albicans* en quienes no se evidenció actividad antimicrobiana con los compuestos seleccionados a concentraciones $\leq 1000 \mu\text{M}$, por tanto, es

posible que estos compuestos no afecten la viabilidad de otras bacterias que no se desean atacar. Adicionalmente, dentro de la estrategia de búsqueda y selección de los compuestos se tuvo en cuenta la predicción de citotoxicidad, por lo cual, de acuerdo a lo esperado los compuestos no presentaron efectos sobre el crecimiento de un modelo celular humano, es decir, las células FLP a concentraciones $\leq 100 \mu\text{M}$, pero debido a que en las células FLP tratadas con los compuestos se observaron cambios de tamaño y granularidad es importante corroborar estos hallazgos con más líneas celulares y otras técnicas que permitan evaluar otras características celulares, adicionales al crecimiento como la incorporación de DIOC6 (3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide) para la medición del potencial de membrana mitocondrial (123) o pruebas de apoptosis como Anexina V (124).

Además de que los 3 compuestos encontrados no presentaron características citotóxicas, tuvieron la capacidad de inhibir significativamente (<90%) la adhesión *in vitro* de *S. mutans* en microplacas de poliestireno a concentraciones de 200 μM , inclusive el compuesto ZI-187 a 100 μM continúa presentando una inhibición significativa. Al igual que en este trabajo, diversos estudios se han enfocado en interrumpir alguno de los tres mecanismos importantes para el desarrollo de biopelícula de *S. mutans*, como lo es evitar la adhesión dependiente de sucrosa, evitar la adhesión independiente de sucrosa e interrumpir las señales celulares o “*Quorum sensing*” (125). La presente investigación se realizó dentro de las estrategias para evitar la adhesión independiente de sucrosa, la cual ha sido direccionada principalmente a bloquear la sortasa A, una transpeptidasa involucrada en el anclaje de diversas proteínas de superficie celular, incluido el Ag I/II, a través del motivo LPXTG. Se ha encontrado que diversas moléculas pueden disminuir la formación de biopelícula, mediante la inhibición de la sortasa A, por ejemplo, se determinó que la curcumina,

un fenol natural (*Curcuma longa*) posee un IC50: 10 μ M y una MIC de 175 μ M (42), pero a pesar de los múltiples beneficios de esta molécula, también se han evidenciado algunos efectos tóxicos relacionados con las altas dosis de su uso como suplemento en la dieta (126,127), por tanto es importante tener en cuenta para esta molécula su actividad antimicrobiana que podría afectar bacterias importantes en cavidad oral y adicional a ello que presente efectos secundarios como pigmentación dental, dado que es un colorante. Adicionalmente, se han propuesto otros productos naturales como el Morin con IC50: 27,2 μ M (41), un IC50 similar al obtenido por los compuestos ZI-187 y ZI-939 (IC50: 28 μ M). Sin embargo, también se ha reportado actividad antimicrobiana del Morin con algunas bacterias, incluida *S. mutans* (128), por el contrario los compuestos encontrados en este estudio no presentaron actividades citotóxicas o antimicrobianas a concentraciones de 100 y 1000 μ M, respectivamente. Por último, la simulación de dinámica molecular soporta estos hallazgos ya que en las interacciones complejo ligando, durante 300ns, el compuesto ZI-187 posiblemente se mueve en el “*pocket*” de la proteína 3IPK, pero no drásticamente pues se mantiene estable; además, se evidencian algunas fluctuaciones en los residuos de amino ácidos de la proteína 3IPK cuando se compara su estructura APO con su estructura en el complejo de interacción (3IPK/ZI-187), lo que podría ser consistente con los residuos específicos de 3IPK que interactúan con ZI-187, ya que fueron identificados diferentes tipos de interacciones de ZI-187 con residuos en esas ubicaciones como Leu 553 - Asp 554 - Thr 586 - Val 587 y Lys 811 - Lys 812 - Asn 814 - Ile 815 - Trp 816 (Tabla 8).

Finalmente, esta investigación permitió encontrar 3 compuestos ZI-197, ZI-939 y ZI-906 con capacidad inhibitoria de la adhesión de *S. mutans*, los cuales fueron seleccionados por su afinidad al Ag I/II, siendo este el primer reporte que utiliza esta adhesina como blanco.

Adicionalmente, permitió estandarizar una serie de pasos para definir una estrategia virtual para la búsqueda y selección de compuestos, con bajas características citotóxicas (Figura 18), pues, aunque en esta investigación los compuestos encontrados no presentaron dichas características es importante continuar con otros ensayos que permitan corroborarlo y aunque esta estrategia utilizó a *S. mutans* LT-11, podría ser aplicable a otros patógenos, para la búsqueda de inhibidores.

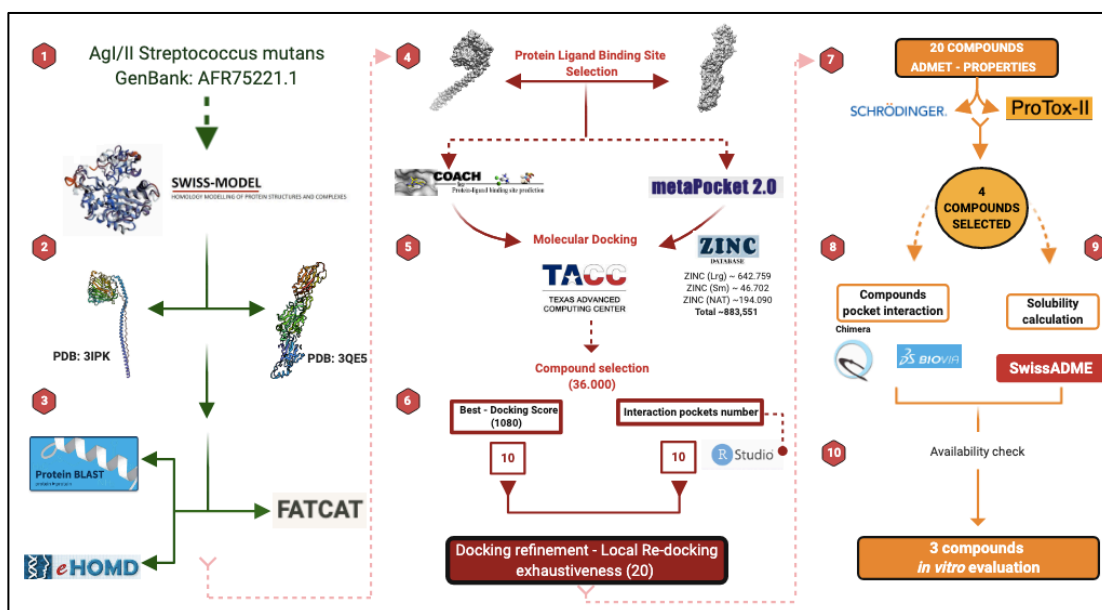


Figura 18. Estrategia computacional propuesta para la búsqueda y selección de compuestos: Descripción del protocolo de análisis computacional para la búsqueda y selección de compuestos con potencial inhibitorio de la adhesión de *S. mutans*. Diagrama creado en BioRender.com

CAPITULO VI

5 CONCLUSIONES

Dado que la caries es una patología multifactorial, su prevención no es algo trivial y aunque se han propuesto diversos mecanismos para evitar la formación de la placa dental, es importante

continuar buscando compuestos que sean selectivos y seguros, tratando que minimizar los efectos secundarios sobre el paciente y sobre los microorganismos que son de importancia para el mantenimiento de la salud bucal. En esta investigación se propuso una estrategia de búsqueda de compuestos, bajo un modelo cariogénico de la bacteria *S. mutans*, sin embargo, esta estrategia puede ser aplicable a la búsqueda de compuestos para cualquier patógeno, gracias a ello se obtuvieron 3 compuestos ZI-187 (IC 50: 30,7 μ M), ZI-939 (IC:50: 12,6 μ M) y ZI-906 (IC50: 78,6 μ M), con capacidad de inhibir mas de un 90% la adhesión de *S. mutans*-LT11 a microplacas de poliestireno, siendo compuestos que no presentaron características tóxicas predictivas, corroboradas *in vitro* en un modelo celular humano en el que se utilizaron fibroblastos de ligamento periodontal tratados por 24 horas con 100 μ M de cada compuesto y no se afectó su crecimiento. Adicionalmente, no se observó actividad antimicrobiana sobre *S. mutans* LT-11 ni *C. albicans* - NCPF 3179, a concentraciones de 1000, 100 y 10 μ M expuestas a los compuestos por el mismo tiempo. Por otro lado, usando como modelo el compuesto ZI-187 (100 μ M) se observó que no hay efectos sobre la morfología bacteriana y finalmente se corroboró la estabilidad y afinidad de la unión entre al compuesto ZI-187 y la proteína 3IPK, mediante una simulación de dinámica molecular por un periodo de 300 ns. Dado lo anterior, estos compuestos son promisorios para la prevención de la co-adhesión y la co-agregación de *S. mutans*, sin presentar efectos adversos sobre las células del huésped o sobre su flora microbiana, siendo ideales para la continuidad de estudios posteriores que permitan continuar en la búsqueda de una terapia cariogénica selectiva.

CAPITULO VII

6 RECOMENDACIONES

Esta investigación genera diversos interrogantes, importantes para la generación de nuevos proyectos de investigación orientados al establecimiento de compuestos que puedan ser usados para prevenir el desarrollo de la biopelícula dental y por tanto del desarrollo de caries. Por ello, sería recomendable realizar una evaluación de los compuestos propuestos en el presente trabajo, en otros modelos celulares para corroborar que no presentan citotoxicidad, evaluar si los compuestos tienen la capacidad de inhibir la adhesión de otras bacterias cariogénicas, establecer modelos de biopelícula mono-multiespecies para evaluar si los compuestos, además de inhibir la adhesión, tienen capacidad inhibir la formación de biopelícula en diferentes tiempos (24, 48, 72 horas) y si tienen la capacidad disgregar la biopelícula ya establecida. Un complemento a esto ensayos sería analizar la producción de EPS, de niveles de proteínas adhesinas cuando *S. mutans* es tratado con los compuestos y se podría realizar un análisis transcriptómico de biopelículas sometidas al tratamiento de los compuestos que permita conocer que genes y como varían su expresión al ser sometidos a estos compuestos, para finalmente poder establecer modelos cariogénicos *in vivo* en modelo ratón, y evaluar la capacidad anticariogénica de los compuestos.

CAPITULO VIII

7 ANEXOS

Anexos 1: Secuencia de comandos o "script" ejecutada en el paquete R-studio (Versión 1.0.156) para la búsqueda de compuestos que se encontraron con mayor frecuencia en los diferentes sitios de unión de ligando en todos los acoplamientos:

```
setwd("C:/Users/admin/Desktop")  
  
a<-read.table("todas copy.txt", header=TRUE,sep="\t")  
  
x1<-as.vector(a[,1])  
  
x2<-as.vector(a[,2])  
  
x3<-as.vector(a[,3])  
  
x4<-as.vector(a[,4])  
  
x5<-as.vector(a[,5])  
  
x6<-as.vector(a[,6])  
  
x7<-as.vector(a[,7])  
  
x8<-as.vector(a[,8])  
  
x9<-as.vector(a[,9])  
  
x10<-as.vector(a[,10])  
  
x11<-as.vector(a[,11])  
  
x12<-as.vector(a[,12])  
  
  
x<-c(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9,x10,x11,x12)  
  
length(x)
```

```

tab<-table(x)

dat<-as.data.frame(tab)

data<-dat[rev(order(dat$Freq)),]

write.table(data,"Lrg_freq.txt",sep="\t")

```

Anexos 2: Resultados de los alineamientos se secuencia para las proteínas 3IPK y 3QE5 en bases de datos de secuencias proteicas de humanos, procariotas y bacterias orales.

Alineamientos BLAST-P:

1. 3IPK:

```
>3IPK:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```

AANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKAAYEAAVAANNAANAALTAENT
AIKRNADAKADYEAKLAKYQADLAKYQKDLADYPVKLKAYEDEQTSIKAALAELEK
HKNEDGNLTEPSAQNLVYDLEPNANLSLTTDGKFLKASAVDDAFSKSTSKAKYDQKILQ
LDDLDITNLEQSNDVASSMELYGNFGDKAGWSTTVSNNSQVKWGSVLLERGSATATY
TNLQNSYYNGKKISKIVYKYTVDPKSKFQGQKVWLGIFTDPTLGVFASAYTGQVEKNTS
IFIKNEFTFYDEDGKPINFDNALLSVASLNREHNSIEMAKDYSKGFVKISGSSIGEKNGMI
YATDTLNFKQGEGSRWTMYKNSQAGSGWDSSDAPNSWYGAGAIKMSGPNNYVTVG
ATSATNVMPVSDMPVVPVKDNTDGKKPNIWYSLNGKIRAVNVPKVTKEKPTPPVKPTA
PTKPTYETEKPLKPAPVAPNYEKEPTPPTRLEHHHHHHH

```

- Homo sapiens (taxid:9606)

select all 16 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin isoform 3 precursor [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	NP_003377.2
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 3 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04411.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 3 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01433.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 6 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04413.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin isoform 6 precursor [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	NP_775082.2
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 6 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01436.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 5 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04412.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 5 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01435.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 1 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01431.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 1 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04410.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 4 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01434.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin variant 2 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAK01432.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 2 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04415.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin splice variant 4 [Homo sapiens]	43.9	43.9	16%	0.003	36.26%	AAL04414.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin isoform CRA_a [Homo sapiens]	43.1	43.1	16%	0.004	34.44%	EAW76487.1
<input checked="" type="checkbox"/> zonadhesin [Homo sapiens]	34.7	34.7	9%	2.1	38.89%	AAC78790.1

- Prokaryota (taxid:2), sin humano

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Crystal Structure Of A3vp1 Of AgIII OF STREPTOCOCCUS MUTANS [Streptococcus mutans]	1015	1015	100%	0.0	100.00%	3IOX_A
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1011	1250	98%	0.0	100.00%	WP_049474530.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1010	1249	98%	0.0	100.00%	WP_024781686.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1009	1249	98%	0.0	99.80%	WP_142362063.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1008	1248	98%	0.0	99.80%	WP_024786327.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1008	1246	98%	0.0	99.59%	WP_142362010.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1007	1246	98%	0.0	99.59%	WP_142362050.1
<input checked="" type="checkbox"/> cell surface antigen [Streptococcus mutans 11SSST2]	1003	1143	98%	0.0	99.39%	EMB69207.1
<input checked="" type="checkbox"/> cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1000	1245	98%	0.0	100.00%	WP_024781655.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	998	1244	98%	0.0	99.80%	ATN39002.1
<input checked="" type="checkbox"/> cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	998	1243	98%	0.0	99.80%	WP_032525988.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	998	1242	98%	0.0	99.80%	ATN39004.1
<input checked="" type="checkbox"/> antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	997	1214	98%	0.0	99.59%	WP_140801057.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	997	1139	98%	0.0	99.59%	ATN38988.1
<input checked="" type="checkbox"/> surface protein adhesin [Streptococcus mutans]	997	1239	98%	0.0	99.80%	ACV69919.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	997	1139	98%	0.0	99.59%	ATN38987.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	997	1226	98%	0.0	99.59%	AFR75218.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein PHG01_00582 [Streptococcus mutans PKUSS-HG01]	997	1242	98%	0.0	99.80%	ESS19084.1
<input checked="" type="checkbox"/> cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	997	1241	98%	0.0	99.59%	WP_023471046.1
<input checked="" type="checkbox"/> AgI/II [Streptococcus mutans]	997	1226	98%	0.0	99.59%	ATN39019.1
<input checked="" type="checkbox"/> PA [Streptococcus mutans]	996	1224	98%	0.0	99.59%	AIV0623.1
<input checked="" type="checkbox"/> cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	996	1226	98%	0.0	99.59%	WP_065868347.1

- Prokaryota (taxid:2), sin Homo sapiens (taxid:9606) y sin Streptococcus mutans (taxid:1309)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	agglutinin receptor SSP-5 [Streptococcus troglodytae]	978	1200	98%	0.0	96.93%	BAQ24775.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein C6A31_10010 [Streptococcus anginosus]	884	1013	98%	0.0	88.75%	PRT75302.1
<input checked="" type="checkbox"/>	agglutinin receptor [Streptococcus anginosus]	882	882	98%	0.0	88.75%	PRT64203.1
<input checked="" type="checkbox"/>	agglutinin receptor [Streptococcus anginosus]	881	881	98%	0.0	88.75%	PRT75754.1
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus]	880	1430	98%	0.0	88.75%	WP_041331917.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	877	1100	98%	0.0	88.96%	WP_059221237.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	877	1230	98%	0.0	88.75%	WP_157622002.1
<input checked="" type="checkbox"/>	agglutinin receptor [Streptococcus anginosus]	876	930	97%	0.0	88.89%	PRT72348.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	875	978	98%	0.0	88.96%	WP_106382360.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen, partial [Streptococcus anginosus 1505]	874	1071	96%	0.0	88.98%	GAD43376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	874	1074	98%	0.0	88.96%	WP_150889394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glucan-binding protein C [Streptococcus sp. CM7]	872	956	97%	0.0	88.71%	EUC76982.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	867	1077	98%	0.0	88.96%	WP_125261457.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	837	837	96%	0.0	85.00%	WP_125364452.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	837	837	96%	0.0	85.00%	WP_096363211.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_045772712.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_061596226.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_061583197.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_061597127.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	828	981	98%	0.0	81.87%	WP_046164904.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus parasanguinis]	828	1093	98%	0.0	82.21%	WP_061590679.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	827	980	98%	0.0	81.87%	WP_125402149.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus macacae]	825	919	99%	0.0	84.24%	WP_003079727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	811	858	88%	0.0	89.73%	WP_049533276.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	810	859	96%	0.0	87.71%	WP_003073967.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	807	856	96%	0.0	83.54%	WP_020999201.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	805	848	97%	0.0	87.78%	WP_117275604.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	799	1009	98%	0.0	86.86%	WP_049514532.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	797	846	96%	0.0	86.25%	WP_009569520.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	797	1006	98%	0.0	86.45%	WP_143969960.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	797	841	96%	0.0	86.25%	WP_151620754.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	796	845	96%	0.0	86.04%	WP_102573622.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC36C04]	795	795	85%	0.0	90.14%	WP_070867449.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	795	844	96%	0.0	86.04%	WP_125375727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC057E02]	795	843	85%	0.0	90.14%	WP_070496734.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	795	843	96%	0.0	86.04%	WP_125455624.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC066E07]	795	843	85%	0.0	90.14%	WP_070670096.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	795	843	96%	0.0	86.04%	WP_117281658.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein C6A32_08210 [Streptococcus anginosus]	794	955	98%	0.0	86.45%	PRT67375.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus orisratti]	792	1236	99%	0.0	79.80%	WP_018375205.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus oralis]	787	1048	98%	0.0	78.21%	WP_045593440.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	786	941	98%	0.0	78.00%	WP_111723178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	protein I/II V-region [Streptococcus intermedius]	786	786	77%	0.0	99.22%	AAF20184.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glucan-binding protein C [Streptococcus sp. SR1]	786	882	98%	0.0	79.59%	EUC79727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative cross-wall-targeting lipoprotein signal [Streptococcus oralis SK313]	785	1044	98%	0.0	79.35%	EGV02484.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. CCH8-C6]	785	939	97%	0.0	77.91%	WP_060976848.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus oralis]	785	1045	98%	0.0	79.35%	WP_084939590.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus oralis]	784	1044	98%	0.0	79.14%	WP_084938853.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	784	1046	98%	0.0	78.00%	WP_061598600.1
<input checked="" type="checkbox"/>	protein I/II V-region [Streptococcus constellatus]	784	784	77%	0.0	98.97%	AAF20183.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus gordonii]	783	941	98%	0.0	78.21%	WP_096754851.1

- Bacterias orales: HOMD

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
SEQF1382_01494	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-686 Streptoco...		838	0.0
SEQF1069_00588	Cell surface antigen I/II [HMT-686 Streptococcus ...		770	0.0
SEQF1703_01156	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...		746	0.0
SEQF2424_01704	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...		729	0.0
SEQF2593_01725	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...		719	0.0
SEQF2592_01743	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...		693	0.0
SEQF2221_01887	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		682	0.0
SEQF1846_01888	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-594 Streptoco...		665	0.0
SEQF2247_00434	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-768 Streptoco...		664	0.0
SEQF2017_02195	Agglutinin receptor [HMT-758 Streptococcus sangui...		659	0.0
SEQF1605_01845	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-534 Granulica...		658	0.0
SEQF1998_01651	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		646	0.0
SEQF1066_00211	Agglutinin receptor [HMT-622 Streptococcus gordon...		644	0.0
SEQF2363_01411	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...		638	0.0
SEQF2361_01702	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...		638	0.0
SEQF2336_00331	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...		638	0.0
SEQF2220_00216	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		636	0.0
SEQF2342_01776	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		633	e-180
SEQF1888_01766	Agglutinin receptor [HMT-070 Streptococcus oralis...		630	e-179
SEQF1913_00143	Agglutinin receptor [HMT-071 Streptococcus oralis...		625	e-177
SEQF2905_00312	Agglutinin receptor [HMT-064 Streptococcus sp. HM...		624	e-177
SEQF2009_00058	Agglutinin receptor [HMT-758 Streptococcus sangui...		622	e-176
SEQF2343_00051	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		620	e-176
SEQF2340_00671	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		615	e-174
SEQF2005_00359	Cell surface antigen I/II [HMT-707 Streptococcus ...		613	e-174
SEQF2023_00222	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		525	e-147
SEQF1917_01627	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		525	e-147
SEQF2018_00173	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		454	e-126
SEQF2479_02117	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		453	e-126
SEQF1070_00333	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		453	e-126
SEQF2014_00327	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		452	e-125
SEQF2008_02133	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		452	e-125
SEQF2010_01499	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		451	e-125
SEQF2012_00323	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		451	e-125
SEQF1029_00762	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-111 Parvimona...		451	e-125
SEQF2011_02164	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		448	e-124
SEQF2016_00860	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		446	e-124
SEQF2015_01544	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		444	e-123
SEQF2013_01497	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...		440	e-122
SEQF1676_00849	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-110 Parvimona...		417	e-115
SEQF1066_00212	Agglutinin receptor [HMT-622 Streptococcus gordon...		233	2e-59
SEQF2399_00806	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...		226	2e-57
SEQF1480_00168	Agglutinin receptor [HMT-579 Cryptobacterium curt...		165	5e-39
SEQF2630_00094	Agglutinin receptor [HMT-042 Mogibacterium timidu...		154	6e-36

2. 3QE5.

>3QE5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MASMTGGQQMGRIHFHYFKLAVQPQVNKEIRNNNDINIDRTLVAKQSVVKFQLKTADLP
 AGRDETTSFVLVDPLPSGYQFNPEATKAASPGFDVTDNATNTVTFKATAATLATFNADLTKSV
 ATIYPTVVGQVLNDGATYKNNFTLTVNDAYGIKSNVVRVTTTPGKPNPDNPNNNYIKPTKVNKN
 ENGVWIDGKTVLAGSTNYYELTWDLQYKNDRSSADTIQKGFYVDDYPEEAELELRQDLVKITD
 ANGNEVTGVSVDNYTNLEAAPQEIRDVLSKAGIRPKGAFQIFRADNPREFYDTYVKTGIDLKIVS
 PMVVKKQMGQTGGSYENQAYQIDFGNGYASNIVINNVPKINPKKDVTLTLPADTNNVDGQTIP
 LNTVFNRYRLIGGIIPANHSEELFKYNFYDDYDQTDGHDYTGQYKVFADITLKNGVIIKSGTELTQ
 YTTAEVDTTKGAITIKFKEAFLRSVSIDSAFQAESYIQMKRIAVGTFENTYINTVNGVTYSSLEHH
 HHHH

- Homo sapiens (taxid:9606)

select all 4 sequences selected		GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A. The Crystal Structure Of E2-25k And Ubiquitin Complex [Homo sapiens]	36.6	36.6	15%	0.24	31.03%	3K9P_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A. Small Ubiquitin-related Modifier 2 [Homo sapiens]	32.0	32.0	10%	2.6	45.61%	4NPN_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain B. REST COREPRESSOR 1 [Homo sapiens]	32.7	32.7	5%	4.4	58.62%	2IW5_B
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A. Transitional Endoplasmic Reticulum Atpase [Homo sapiens]	31.6	31.6	5%	9.1	51.72%	4KDI_A

- Prokaryota (taxid:2), sin humano

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A_Major_Cell-surface Adhesin Pac [Streptococcus mutans]	1051	2103	100%	0.0	100.00%	3QE5_A
<input checked="" type="checkbox"/>	surface protein adhesin [Streptococcus mutans]	1020	1020	96%	0.0	99.80%	ACV89919.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1019	1019	96%	0.0	99.40%	WP_019314323.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1019	2038	96%	0.0	99.60%	WP_019313548.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1019	2038	96%	0.0	99.60%	WP_024781655.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1019	2038	96%	0.0	99.60%	WP_014834885.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1019	1019	96%	0.0	99.60%	WP_032525988.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Agf/II [Streptococcus mutans]	1019	2038	96%	0.0	99.60%	AFR75153.1
<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Major-cell-surface adhesin Pac; AltName: Full=Antigen I/II; Flags: Precursor [Streptococcus mutans]	1018	2037	96%	0.0	99.60%	P1167.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Agf/II [Streptococcus mutans]	1018	2037	96%	0.0	99.40%	AFR75212.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Agf/II [Streptococcus mutans]	1018	1018	96%	0.0	99.60%	ATN39002.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1018	1018	96%	0.0	99.60%	WP_023471046.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus mutans]	1017	2035	96%	0.0	98.99%	WP_140801057.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein PHG01_0582 [Streptococcus mutans PKUSS-HG01]	1017	2035	96%	0.0	99.60%	ESS19084.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PA [Streptococcus mutans]	1017	2034	96%	0.0	99.40%	BAFR1886.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Agf/II [Streptococcus mutans]	1016	1016	96%	0.0	99.40%	ATN39004.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PA [Streptococcus mutans]	1016	2033	96%	0.0	99.40%	BAFR1896.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1016	1016	96%	0.0	98.99%	WP_063331118.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PA [Streptococcus mutans]	1015	2030	96%	0.0	99.40%	BAFR1889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1015	2030	96%	0.0	98.99%	WP_065688347.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PA [Streptococcus mutans]	1014	2029	96%	0.0	98.99%	BAFR1892.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Agf/II [Streptococcus mutans]	1014	2029	96%	0.0	98.99%	ATN39011.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cell surface antigen I/II [Streptococcus mutans]	1014	2029	96%	0.0	98.99%	WP_002311539.1

- Prokaryota (taxid:2), sin Homo sapiens (taxid:9606) y sin Streptococcus mutans (taxid:1309).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	932	932	96%	0.0	93.35%	WP_117283309.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	932	932	96%	0.0	93.55%	WP_102588327.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	932	932	96%	0.0	93.55%	WP_125364452.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	931	931	96%	0.0	93.55%	WP_096363211.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	931	931	96%	0.0	93.35%	WP_030275937.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	930	930	96%	0.0	93.55%	WP_00569520.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	930	930	96%	0.0	93.35%	WP_020999201.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	929	929	96%	0.0	93.35%	WP_102569927.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	929	929	96%	0.0	92.94%	WP_125375727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	929	929	96%	0.0	92.94%	WP_117281658.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.15%	WP_117277307.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.15%	WP_082312038.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.35%	WP_021003261.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.35%	WP_152455624.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.15%	WP_150204744.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	928	928	96%	0.0	93.15%	WP_117278897.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	927	927	96%	0.0	93.15%	WP_125442356.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	927	927	96%	0.0	92.94%	WP_030273967.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	927	927	96%	0.0	93.15%	WP_102373622.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	927	927	96%	0.0	92.14%	WP_143869960.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	927	927	96%	0.0	93.15%	WP_117280830.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	926	926	96%	0.0	93.15%	WP_117276381.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	926	926	96%	0.0	92.94%	WP_117275604.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	926	926	96%	0.0	93.15%	WP_125394244.1

<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	926	926	96%	0.0	93.15%	WP_151620754.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	926	926	96%	0.0	92.94%	WP_125396115.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	923	923	96%	0.0	91.94%	WP_143969961.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus intermedius]	923	923	96%	0.0	92.94%	WP_125412115.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A, Probable cell-surface antigen I/II [Streptococcus intermedius]	919	919	95%	0.0	93.54%	6E3F_A
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	913	913	96%	0.0	91.94%	WP_133161049.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	900	900	94%	0.0	92.23%	WP_152907041.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	889	889	94%	0.0	91.00%	WP_152907042.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus macacae]	885	885	96%	0.0	87.90%	WP_003079727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	883	883	96%	0.0	84.27%	WP_059221237.1
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus]	882	882	96%	0.0	84.07%	WP_041331917.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	882	882	96%	0.0	84.27%	WP_125261457.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	881	881	96%	0.0	84.27%	WP_106382360.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	880	880	96%	0.0	84.27%	WP_150889394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	879	879	96%	0.0	84.07%	WP_157622002.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC057E02]	877	877	96%	0.0	84.27%	WP_070496734.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC066E07]	876	876	96%	0.0	84.27%	WP_070670096.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus anginosus]	876	876	96%	0.0	84.27%	WP_049533276.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. HMSC36C04]	875	875	96%	0.0	84.27%	WP_070867449.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sp. BCA20]	874	874	91%	0.0	93.45%	WP_125328560.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	870	870	96%	0.0	84.07%	WP_142390905.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	870	870	96%	0.0	84.07%	WP_142390873.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	869	869	96%	0.0	84.07%	WP_133164434.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	869	869	96%	0.0	84.07%	WP_003028464.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sp. OBRC6]	869	869	96%	0.0	84.07%	WP_037612878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sp. CM7]	869	869	96%	0.0	84.07%	WP_037607726.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sp. AC15]	868	868	96%	0.0	84.07%	WP_037619099.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein C6A30_06035 [Streptococcus anginosus]	868	868	96%	0.0	84.07%	PRT64855.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein C6A26_07810 [Streptococcus anginosus]	868	868	96%	0.0	84.07%	PRT177009.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sp. HMSC061D01]	868	868	96%	0.0	84.07%	WP_148129984.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus anginosus]	868	868	96%	0.0	84.07%	WP_133162781.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cell surface antigen I/II precursor [Streptococcus sp. BCA20]	816	816	85%	0.0	94.09%	RSJ30801.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus orisratti]	816	816	96%	0.0	81.85%	WP_018375205.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	812	812	96%	0.0	76.81%	WP_019771067.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	811	811	96%	0.0	77.22%	WP_019783151.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	809	809	96%	0.0	76.81%	WP_019792647.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	809	809	96%	0.0	76.81%	WP_019789902.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_019787418.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_019779512.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_019775556.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_019785437.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus downei]	808	808	96%	0.0	76.81%	WP_002996622.1
<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Cell surface antigen I/II; Contains: RecName: Full=Cell surface antigen II; Flags: Precursor [Streptococcus downei]	807	807	96%	0.0	76.61%	P21979.2
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	807	807	96%	0.0	76.81%	WP_094966356.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	807	807	96%	0.0	76.81%	WP_019795519.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	806	806	96%	0.0	76.61%	WP_019786426.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	806	806	96%	0.0	76.61%	WP_109982692.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	806	806	96%	0.0	76.61%	WP_028798548.1
<input checked="" type="checkbox"/>	SpaA [Streptococcus sobrinus]	805	805	96%	0.0	76.61%	AAB30711.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	805	805	96%	0.0	76.61%	WP_019769449.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	805	805	96%	0.0	76.61%	WP_021673440.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	805	805	98%	0.0	75.49%	WP_019773560.1

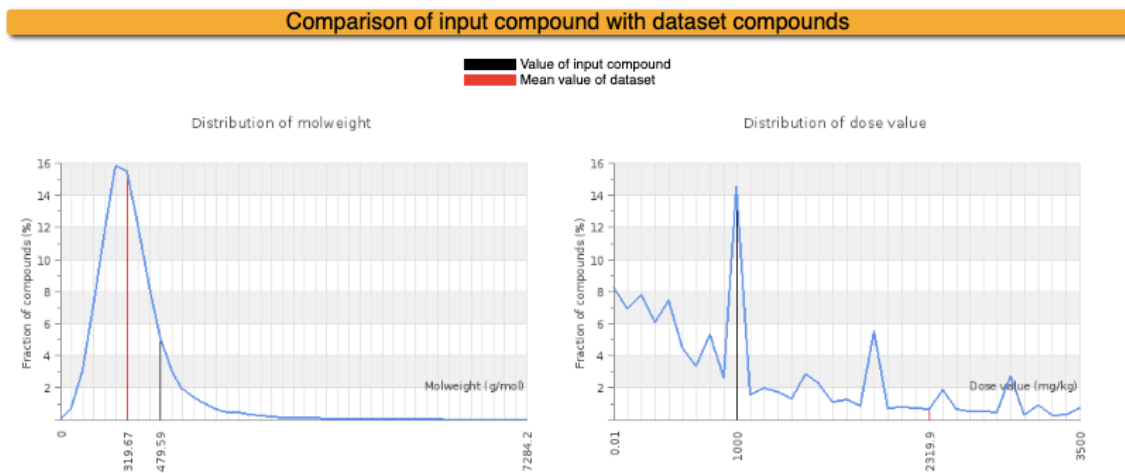
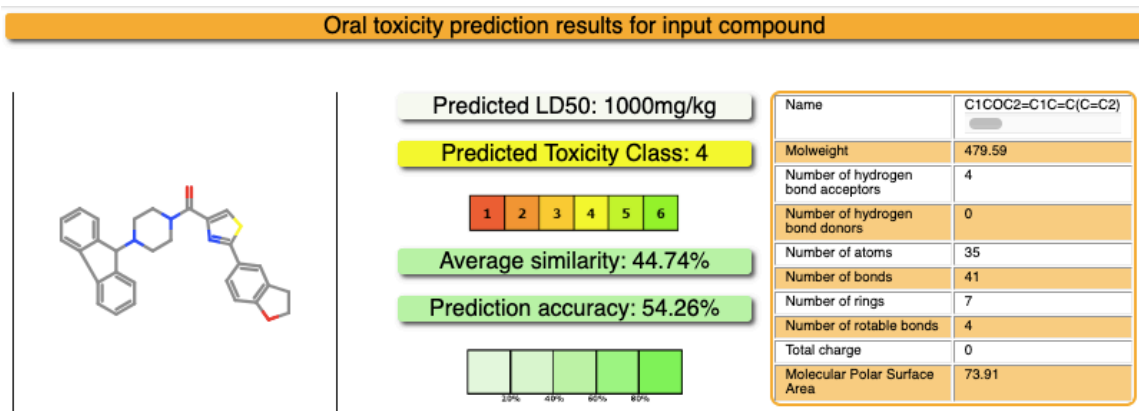
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	803	803	98%	0.0	75.49%	WP_019793184.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	803	803	96%	0.0	76.41%	WP_019776447.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	801	801	97%	0.0	75.64%	WP_019772413.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sobrinus]	801	801	97%	0.0	75.64%	WP_019792058.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	800	800	96%	0.0	76.81%	WP_019788472.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sobrinus]	799	799	98%	0.0	75.30%	WP_002962159.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Streptococcus sobrinus]	798	798	98%	0.0	75.30%	WP_019791824.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus criceti]	798	798	96%	0.0	76.21%	WP_004225946.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus orisasin]	783	783	96%	0.0	75.25%	WP_057490734.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus orisasin]	779	779	96%	0.0	74.19%	WP_057490735.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus criceti]	778	778	98%	0.0	73.03%	WP_004229363.1
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [unclassified Granulicatella]	765	765	96%	0.0	78.43%	WP_049554376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Granulicatella sp. HMSC31F03]	764	764	96%	0.0	78.23%	WP_070444487.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [Granulicatella adiacens]	764	764	96%	0.0	78.23%	WP_005605884.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sobrinus]	762	762	93%	0.0	74.90%	WP_019779950.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sp. AS14]	746	746	96%	0.0	70.97%	WP_009659817.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	743	743	96%	0.0	70.77%	WP_125371155.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	742	742	96%	0.0	70.77%	WP_149565981.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	741	741	96%	0.0	70.77%	WP_125382098.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	740	740	96%	0.0	70.16%	WP_125406274.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	739	739	96%	0.0	70.36%	WP_125330849.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	739	739	96%	0.0	70.77%	WP_125402202.1
<input checked="" type="checkbox"/>	antigen I/II family LPXTG-anchored adhesin [Streptococcus sanguinis]	738	738	96%	0.0	70.16%	WP_125445414.1

- Bacterias orales:

Sequences producing significant alignments:		score	E
		(bits)	Value
SEQF1382_01494	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-686 Streptoco...	862	0.0
SEQF1069_00588	Cell surface antigen I/II [HMT-686 Streptococcus ...	854	0.0
SEQF2593_01725	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...	816	0.0
SEQF2424_01704	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...	816	0.0
SEQF2363_01411	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...	816	0.0
SEQF2361_01702	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...	816	0.0
SEQF2336_00331	Cell surface antigen I/II [HMT-644 Streptococcus ...	816	0.0
SEQF2592_01743	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...	815	0.0
SEQF1703_01156	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-644 Streptoco...	814	0.0
SEQF1692_01183	Cell surface antigen I/II [HMT-543 Streptococcus ...	750	0.0
SEQF1605_01845	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-534 Granulica...	689	0.0
SEQF1846_01888	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-594 Streptoco...	688	0.0
SEQF2247_00434	Major cell-surface adhesin Pac [HMT-768 Streptoco...	688	0.0
SEQF2517_01505	Cell surface antigen I/II [HMT-768 Streptococcus ...	687	0.0
SEQF2017_02195	Agglutinin receptor [HMT-758 Streptococcus sangui...	629	e-178
SEQF2016_00860	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	629	e-178
SEQF2013_01497	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	628	e-178
SEQF1066_00212	Agglutinin receptor [HMT-622 Streptococcus gordon...	624	e-177
SEQF2012_00323	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	624	e-177
SEQF2014_00327	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	624	e-177
SEQF2008_02133	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	624	e-177
SEQF2015_01544	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	622	e-177
SEQF2005_00359	Cell surface antigen I/II [HMT-707 Streptococcus ...	622	e-177
SEQF1066_00211	Agglutinin receptor [HMT-622 Streptococcus gordon...	622	e-177
SEQF2479_02117	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	622	e-176
SEQF1070_00333	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	622	e-176
SEQF2905_00312	Agglutinin receptor [HMT-064 Streptococcus sp. HM...	621	e-176
SEQF2341_01747	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	621	e-176
SEQF2343_00051	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	620	e-176
SEQF2010_01499	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	620	e-176
SEQF1998_01651	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	620	e-176
SEQF2018_00173	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	619	e-176
SEQF2009_00058	Agglutinin receptor [HMT-758 Streptococcus sangui...	619	e-176
SEQF1913_00143	Agglutinin receptor [HMT-071 Streptococcus oralis...	619	e-176
SEQF2011_02164	Cell surface antigen I/II [HMT-758 Streptococcus ...	619	e-176
SEQF2023_00222	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF1917_01627	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF2399_00806	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF2340_00671	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF2220_00216	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF1888_01766	Agglutinin receptor [HMT-070 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF2342_01776	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	617	e-175
SEQF2221_01887	Agglutinin receptor [HMT-707 Streptococcus oralis...	624	e-117
SEQF2766_01657	Cell surface antigen I/II [HMT-767 Streptococcus ...	333	8e-90
SEQF1337_01186	Agglutinin receptor [HMT-537 Streptococcus agalac...	329	2e-88
SEQF1332_01396	Agglutinin receptor [HMT-537 Streptococcus agalac...	329	2e-88

Anexos 3: Resultados del análisis de predicción de citotoxicidad de los compuestos ZI-187, ZI-939, ZI-906 y la clorhexidina obtenidos con el programa en línea Protox-II.

○ **ZINC19835187:**

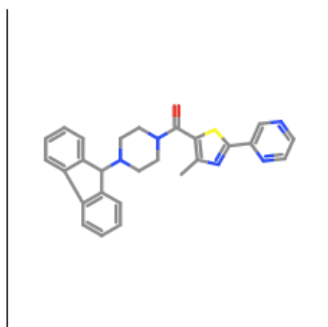


Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.70
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.67
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.97
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.66
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.60
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.64
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.98
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.88
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.86
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.96
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.95
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.86
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.86
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.81
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.92
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.92

○ ZINC19924906:

Oral toxicity prediction results for input compound



Predicted LD50: 350mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



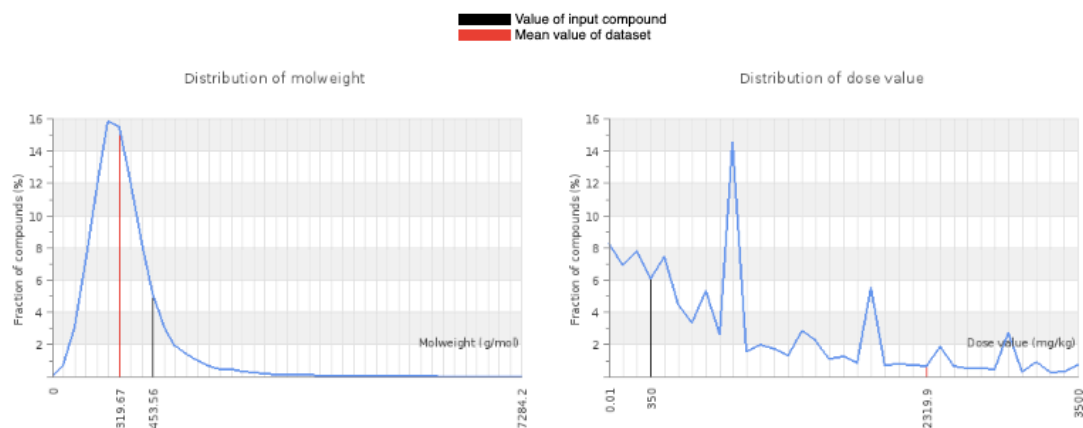
Average similarity: 51.79%

Prediction accuracy: 67.38%



Name	Cc1c(sc(n1)c2cnccn2)C/c6c4cccc6
Molweight	453.56
Number of hydrogen bond acceptors	5
Number of hydrogen bond donors	0
Number of atoms	33
Number of bonds	38
Number of rings	6
Number of rotatable bonds	4
Total charge	0
Molecular Polar Surface Area	90.46

Comparison of input compound with dataset compounds

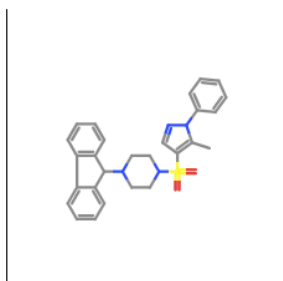


Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.67
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.70
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.59
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.66
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.76
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.86
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.84
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.95
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.93
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.95
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.95
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.84
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.93
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.96

○ ZINC19924939:

Oral toxicity prediction results for input compound



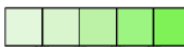
Predicted LD50: 184mg/kg

Predicted Toxicity Class: 3



Average similarity: 40.4%

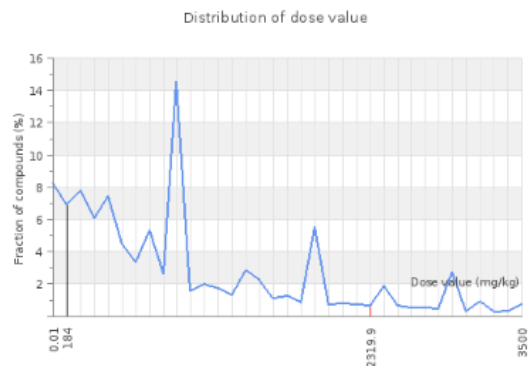
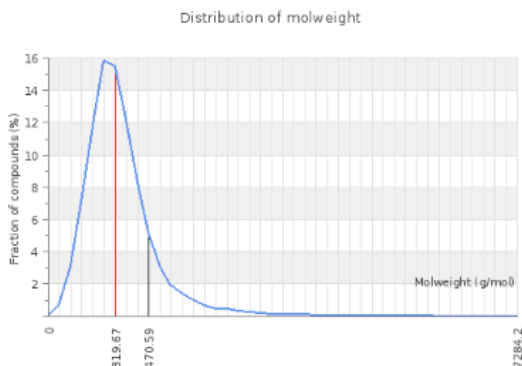
Prediction accuracy: 54.26%



Name	Cc1c(cnn1c2ccccc2)S(=O)(=O)N3CCN(CC3)C4c5cc6c4ccccc6
Molweight	470.59
Number of hydrogen bond acceptors	5
Number of hydrogen bond donors	0
Number of atoms	34
Number of bonds	39
Number of rings	6
Number of rotatable bonds	4
Total charge	0
Molecular Polar Surface Area	66.82

Comparison of input compound with dataset compounds

■ Value of input compound
■ Mean value of dataset



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.67
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.51
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.74
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.65
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.96
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.89
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.90
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.95
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.97
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.97
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.84
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.89
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.98

Anexos 4: Resultados de las pruebas estadísticas realizadas a los datos obtenidos de las pruebas de actividad antimicrobiana de los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a concentraciones de 1000 -100 -10 μ M, sobre el crecimiento de *S. mutans* – LT11, tratadas por 24 horas.

Compuesto ZI - 187	PRUEBA DE NORMALIDAD				Prueba Kruskal-Wallis		Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	
	D'Agostino & Pearson		Shapiro-Wilk		P - valor	Las medianas varían sign. (P < 0,05)? (Resumen)	Significancia ?	Resumen
	P - valor	Pureza de normalidad aprobada?	P - valor	Pureza de normalidad aprobada?				
Control de solvente (DMSO 10%)	0,0434	NO	0,2495	SI	< 0.0001	SI (****)	NO	NS
Control muerte (CHX 0.2%)	0,5359	SI	0,8697	SI			SI	***
1000 μ M	0,6251	SI	0,3856	SI			NO	NS
100 μ M	0,8762	SI	0,4895	SI			NO	NS
10 μ M	0,8613	SI	0,9794	SI			NO	NS
Compuesto ZI - 939								
Control de solvente (DMSO 10%)	0,0434	NO	0,2495	SI	< 0.0001	SI (****)	NO	NS
Control muerte (CHX 0.2%)	0,5359	SI	0,8697	SI			SI	**
1000 μ M	0,5511	SI	0,4583	SI			NO	NS
100 μ M	0,5031	SI	0,2903	SI			NO	NS
10 μ M	0,4666	SI	0,4513	SI			NO	NS
Compuesto ZI - 906								
Control de solvente (DMSO 10%)	0,0434	NO	0,2495	SI	< 0.0001	SI (****)	NO	ns
Control muerte (CHX 0.2%)	0,5359	SI	0,8697	SI			SI	***
1000 μ M	0,4354	SI	0,1456	SI			NO	ns
100 μ M	0,5394	SI	0,1464	SI			NO	ns
10 μ M	0,9217	SI	0,9419	SI			NO	ns

Anexos 5. Resultados de las pruebas estadísticas realizadas a los datos obtenidos de las pruebas de actividad antimicrobiana de los compuestos ZI-187, ZI-939 y ZI-906 a concentraciones de 1000 -100 -10 μM , sobre el crecimiento de *C. albicans* - NCPF 3179, tratadas por 24 horas.

Compuesto ZI - 187	PRUEBA DE NORMALIDAD				Prueba Kruskal-Wallis		Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	
	D'Agostino & Pearson		Shapiro-Wilk		P - valor	Las medianas varían sign. (P < 0,05)? (Resumen)	Significancia ?	Resumen
	P - valor	Pureza de normalidad aprobada?	P - valor	Pureza de normalidad aprobada?				
Control solvente (DMSO 10%)	0,8607	SI	0,7663	SI	< 0.0001	SI (****)		
Control muerte (CHX 0.2%)	0,3745	SI	0,1115	SI			NO	NS
1000 μM	0,1431	SI	0,0371	NO			NO	NS
100 μM	0,4275	SI	0,341	SI			NO	NS
10 μM	0,7427	SI	0,5363	SI			NO	NS
Compuesto ZI - 939								
Control solvente (DMSO 10%)	0,8607	SI	0,7663	SI	< 0.0001	SI (****)		
Control muerte (CHX 0.2%)	0,3745	SI	0,257	SI			NO	ns
1000 μM	0,9333	SI	0,9854	SI			NO	ns
100 μM	< 0.0001	NO	0,0003	SI			SI	**
10 μM	0,3808	SI	0,0576	SI			SI	**
Compuesto ZI - 906								
Control solvente (DMSO 10%)	0,0434	NO	0,2495	SI	< 0.0001	SI (****)		
Control muerte (CHX 0.2%)	0,5359	SI	0,8697	SI			NO	NS
1000 μM	0,4354	SI	0,1456	SI			NO	NS
100 μM	0,5394	SI	0,1464	SI			SI	*
10 μM	0,9217	SI	0,9419	SI			SI	**

Anexos 6. Certificado de ponencia oral en evento internacional

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Raul Rivera

attended the **8th ASM Conference on Biofilms**

October 7-11, 2018 in Washington, DC

On behalf of the American Society for Microbiology, we thank you for your participation.



Kirsten Olean
Director, ASM Meetings



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Anexos 7. Certificados de participación en eventos nacionales




XII ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS
II ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

MODALIDAD VIRTUAL

25 y 26 de septiembre de 2020

Bogotá D.C., diciembre de 2020

LA ASOCIACION COLOMBIANA DE INFECTOLOGIA –ACIN
CERTIFICA QUE:

El trabajo **“Identificación y evaluación de compuestos con potencial inhibitorio de la adhesión dependiente del antígeno VII de Streptococcus mutans.”** De los autores: Rivera R, Cardona N, Padilla L, Rivera W, Rocha C, Díaz M, Morales S, Martínez M, que se presentó en modalidad oral en EL XII ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS y el II ENCUESTRO ANDINO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, con intensidad horaria de 20 horas virtuales.

Cordialmente,
José Millán Oñate G.
JOSÉ MILLÁN OÑATE GUTIÉRREZ
Presidente ACIN

INFORMES E INSCRIPCIONES:
Carrera 15 No. 118-83
Of. 303 Edificio Galleria
Teléfono: (571) 215 37 14
E-mail: secretaria@acin.org
www.acin.org @acinsonacional



Anexos 8. Portada de artículo publicado.

Article

In Silico Selection and In Vitro Evaluation of New Molecules That Inhibit the Adhesion of *Streptococcus mutans* through Antigen I/II

 Raúl E. Rivera-Quiroga ^{1,2,*}, Néstor Cardona ¹, Leonardo Padilla ², Wbeimar Rivera ³, Cristian Rocha-Roa ⁴, Mayri A. Díaz De Rienzo ⁵, Sandra M. Morales ³ and María C. Martínez ³
¹ Group of Investigation in Oral Health, Faculty of Dentistry, Antonio Nariño University, Av. Bolívar # 49 North 30, Armenia 630001, Quindío, Colombia; nescorcardona@uan.edu.co

² GYMOL Group, Faculty of Health Sciences, Quindío University, Street 12N, Armenia 630001, Quindío, Colombia; lpadilla@uniquindio.edu.co

³ Oral Microbiology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Antioquia, 64 Street No. 52-59, Block 31, No. 216, Health Area, Medellín 050001, Antioquia, Colombia; wbeimar.rivera@udea.edu.co (W.R.); sandra.morales@udea.edu.co (S.M.M.); mcocilia.martinez@udea.edu.co (M.C.M.)

⁴ GEPAMOL Group Faculty of Health Sciences, Quindío University, Street 12N, Armenia 630001, Quindío, Colombia; ccrochar@uqvirtual.edu.co

⁵ School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, James Parsons Building 10.05C, Byrom Street, Liverpool L3 3AF, UK; m.a.diaz@lmu.ac.uk

* Correspondence: rriveraquioga@uan.edu.co; Tel: +57-3128693374; Fax: +57-67494981



Citation: Rivera-Quiroga, R.E.; Cardona, N.; Padilla, L.; Rivera, W.; Rocha-Roa, C.; Díaz De Rienzo, M.A.; Morales, S.M.; Martínez, M.C. In Silico Selection and In Vitro Evaluation of New Molecules that Inhibit the Adhesion of *Streptococcus mutans* through Antigen I/II. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 377. <https://doi.org/10.3390/ijms22010377>

Received: 14 October 2020

Accepted: 3 December 2020

Published: 31 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Streptococcus mutans* is the main early colonizing cariogenic bacteria because it recognizes salivary pellicle receptors. The Antigen I/II (Ag I/II) of *S. mutans* is among the most important adhesins in this process, and is involved in the adhesion to the tooth surface and the bacterial co-aggregation in the early stage of biofilm formation. However, this protein has not been used as a target in a virtual strategy search for inhibitors. Based on the predicted binding affinities, drug-like properties and toxicity, molecules were selected and evaluated for their ability to reduce *S. mutans* adhesion. A virtual screening of 883,551 molecules was conducted; cytotoxicity analysis on fibroblast cells, *S. mutans* adhesion studies, scanning electron microscopy analysis for bacterial integrity and molecular dynamics simulation were also performed. We found three molecules ZINC19835187 (ZI-187), ZINC19924939 (ZI-939) and ZINC19924906 (ZI-906) without cytotoxic activity, which inhibited about 90% the adhesion of *S. mutans* to polystyrene microplates. Molecular dynamic simulation by 300 nanoseconds showed stability of the interaction between ZI-187 and Ag I/II (PDB: 3IPK). This work provides new molecules that targets Ag I/II and have the capacity to inhibit in vitro the *S. mutans* adhesion on polystyrene microplates.

Keywords: *Streptococcus mutans*; adhesion proteins; antigen I/II; dental caries; structure-based virtual screening; molecular dynamics

1. Introduction

In 2016, dental caries was classified as the most prevalent pathology in the world, affecting 2.4 billion people [1,2]. This pathology is among the oral diseases related to oral microbiota alteration [3], characterized by perforations or structural damage of the teeth, called carious lesions [4]. There are three well-known risk factors for the development of caries: personal factors that are related to socioeconomic status—i.e., dental insurance coverage, attitudes and knowledge about oral health and oral hygiene; oral environmental factors such as saliva, fluoride, chewing gum, pH, bacteria, calcium, phosphates, proteins and factors that directly contribute to the development of caries, such as, the tooth, diet (consumption of sugars), bacterial biofilms and time [5].

Oral microorganisms that cannot adhere to a surface are transported by salivary flow out of the mouth and into the digestive tract, but many oral bacteria possess mechanisms

CAPITULO IX**8 BIBLIOGRAFÍA**

1. Kyu HH, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;
2. Lu M, Xuan S, Wang Z. Oral microbiota: A new view of body health. *Food Sci Hum Wellness* [Internet]. 2019;8(1):8–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>
3. Tanzer JM. Dental Caries is a Transmissible Infectious Disease: The Keyes and Fitzgerald Revolution. *J Dent Res* [Internet]. 1995;74(9):1536–42. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/00220345950740090601>
4. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* [Internet]. 2007;369(9555):51–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607600312>
5. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(7):471–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2381>
6. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2003;1(3):219–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro771>
7. Pecharki D, Petersen FC, Assev S, Scheie AA. Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. *Oral Microbiol*

- Immunol. 2005;20(6):366–71.
8. Matsumoto-Nakano M. Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. Jpn Dent Sci Rev [Internet]. 2018;54(1):22–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.08.002>
 9. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Prim. 2017;3(May).
 10. Pitts NB, Bds F, Rcs FDS, Fds E, Edin RCS, Uk F, et al. Guía ICCMS™ para clínicos y educadores. Glob Collab caries Manag. 2014;
 11. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Brown A, Carter A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 2016;
 12. Claxton L, Taylor M, Kay E. Oral health promotion: the economic benefits to the NHS of increased use of sugarfree gum in the UK. Br Dent J [Internet]. 2016;220(3):121–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4768708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 13. MINSALUD, INS. Caracterización de la salud bucal mediante el análisis de fuentes secundarias de información, Colombia 2010-2011 [Internet]. Vol. 19 N° 6, Informe quincenal epidemiológico nacional. IQEN. 2014. Available from: [file:///C:/Users/lab.informatica/Desktop/IQEN vol 19 2014 num 6.pdf](file:///C:/Users/lab.informatica/Desktop/IQEN%20vol%2019%202014%20num%206.pdf)
 14. MINSALUD. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB - IV 2013-2014 [Internet]. 2014. Available from:

- <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>
15. Mirza K, Khan A, Ali M, Chaudhry S. Oral health knowledge, attitude, and practices and sources of information for diabetic patients in Lahore, Pakistan. *Diabetes Care* [Internet]. 2007;30(12):3046–7. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/30/12/3046.short>
 16. Abiola A, Olayinka A, Mathilda B, Ogunbiyi O, Modupe S, Olubunmi O. A survey of the oral health knowledge and practices of pregnant women in a Nigerian teaching hospital. *Afr J Reprod Health* [Internet]. 2011;15(December):14–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medl&AN=22571100>
<http://sfx.scholarsportal.info/uhn?sid=OVID:medline&id=pmid:22571100&id=doi:&issn=1118-4841&isbn=&volume=15&issue=4&spage=14&pages=14-9&date=2011&title=African+Journal+o>
 17. Mota A, Oswal KC, Sajnani DA, Sajnani AK. Oral Health Knowledge , Attitude , and Approaches of Pre-Primary and Primary School Teachers in Mumbai , India. 2016;2016.
 18. Carneiro L, Kabulwa M, Makyao M, Mrosso G, Choum R. Oral health knowledge and practices of secondary school students, Tanga, Tanzania. *Int J Dent*. 2011;2011.
 19. Martignon S, Bautista G, González M, Lafaurie G, Morales V, Santamaría R. Instrumentos para evaluar conocimientos, actitudes y prácticas en salud oral para padres/cuidadores de niños menores. *Rev Salud Pública* [Internet]. 2008;10(2):308–14. Available from: <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v10n2/v10n2a11.pdf>
 20. González-Martínez F, Sierra Barrios CC, Morales Salinas LE. Conocimientos, actitudes y

- prácticas en salud bucal de padres y cuidadores en hogares infantiles, Colombia. *Salud Publica Mex.* 2011;53(3):247–57.
21. Moreno E, Pedro S, Roales-nieto JG. El Modelo de Creencias de Salud : Revisión Teórica , Consideración ... *Int J Psychol Psychol Ther.* 2003;3(1).
 22. Ontario Agency for Health Protection and Promotion. Evidence Brief: Dental caries prevention in school-aged children : effectiveness of dental / oral hygiene program delivery models. Queen's Print Ontario. 2016;(February).
 23. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5(3):141–7.
 24. Hoceini A, Klouche Khelil N, Ben-Yelles I, Mesli A, Ziouani S, Ghellai L, et al. Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016;6(8):720–6.
 25. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407–17.
 26. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans* . *Gram-Positive Pathog.* 2019;7(1):435–48.
 27. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(4):499–515.
 28. Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X, et al. Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):126–35.

29. Matsushita K, Nisizawa T, Nagaoka S, Kawagoe M, Koga T. Identification of antigenic epitopes in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in humans. *Infect Immun*. 1994;62(9):4034–42.
30. Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol* [Internet]. 1997;23(2):183–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9044252>
31. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, et al. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins: MicroReview. *Mol Microbiol*. 2010;77(2):276–86.
32. Larson MR, Rajashankar KR, Patel MH, Robinette RA, Crowley PJ, Michalek S, et al. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of alpha- and PPII-helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(13):5983–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Larson MR, Rajashankar KR, Crowley PJ, Kelly C, Mitchell TJ, Brady LJ, et al. Crystal structure of the C-terminal region of *Streptococcus mutans* antigen I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. *J Biol Chem*. 2011;286(24):21657–66.
34. Sinha S, Vohora D. *Drug Discovery and Development: An Overview* [Internet]. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*. Elsevier Inc.; 2017. 19–32 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00002-X>
35. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2017;3(4):651–7. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>
36. Mayr LM, Fuerst P. The Future of High-Throughput Screening. *J Biomol Screen* [Internet]. 2008;13(6):443–8. Available from: <http://jbx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1087057108319644>
 37. Barbosa A, Romário D, Avelar S, Gomes G, Albuquerque AR, Gaudencio T. In Silico Approach for the Identification of Potential Targets and Specific Antimicrobials for *Streptococcus mutans*. *Adv Biosci Biotech*. 2014;5(March):373–85.
 38. Zhang Q, Nijampatnam B, Hua Z, Nguyen T, Zou J, Cai X, et al. Structure-Based Discovery of Small Molecule Inhibitors of Cariogenic Virulence. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06168-1>
 39. Yang C, Scoffield J, Wu R, Deivanayagam C, Zou J, Wu H. Antigen I/II mediates interactions between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Mol Oral Microbiol*. 2018;176(3):139–48.
 40. Luo H, Liang DF, Bao MY, Sun R, Li YY, Li JZ, et al. In silico identification of potential inhibitors targeting *Streptococcus mutans* sortase A. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2017;9(1):53–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.58>
 41. Huang P, Hu P, Zhou SY, Li Q, Chen WM. Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *streptococcus mutans*. *Curr Microbiol*. 2014;68(1):47–52.
 42. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013;58(10):1343–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.05.004>
 43. Xia X. Bioinformatics and Drug Discovery. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(15):1709–26.
 44. Dibyajyoti S, Talha Bin E, Swati P. Bioinformatics: The effects on the cost of drug

- discovery. *Gall Med J.* 2013;18(1):44.
45. Gill S, Christopher A, Gupta V, Bansal P. Emerging role of bioinformatics tools and software in evolution of clinical research. *Perspect Clin Res.* 2016;7(3):115.
 46. Chaudhary KK, Mishra N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem [Internet].* 2016;4(3):1029. Available from: www.pdb.org.
 47. Salmaso V, Moro S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Front Pharmacol.* 2018;9(AUG):1–16.
 48. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron [Internet].* 2018;99(6):1129–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
 49. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpi JL. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Adv Appl Bioinforma Chem.* 2015;8(1):37–47.
 50. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–42.
 51. Rivera-Pérez WA, Yépes-Pérez AF, Martínez-Pabón MC. Molecular docking and in silico studies of the physicochemical properties of potential inhibitors for the phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2019;98:164–75.
 52. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova O V, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford) [Internet].* 2010 Jan [cited 2015 Aug 28];2010:baq013. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911848&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 53. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The human oral

- microbiome. *J Bacteriol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2014 Jul 11];192(19):5002–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2944498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Ye Y, Godzik A. FATCAT: A web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(WEB SERVER ISS.):582–5.
 55. Huang B. MetaPocket: A Meta Approach to Improve Protein Ligand Binding Site Prediction. *Omi A J Integr Biol.* 2009;13(4):325–30.
 56. Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics.* 2013;29(20):2588–95.
 57. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009 Dec;30(16):2785–91.
 58. Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model.* 2015;55(11):2324–37.
 59. Schrödinger. Schrödinger Release 2018-1. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Desmond Molecular Dynamics System. 2018.
 60. Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: A web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(W1):53–8.
 61. Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK, Preissner R. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W257–63.
 62. Pfizer Inc. Material Safety Data Sheet Material Safety Data Sheet [Internet]. 2012.

- Available from: https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/PZ00719.pdf
63. Chen D, Oezguen N, Urvil P, Ferguson C, Dann SM, Savidge TC. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci Adv.* 2016;2(3).
 64. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
 65. BIOVIA D. Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: DassaultSystèmes, 2016. Adres <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discoverystudio/visualization/download.php>. 2016;
 66. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7(January):1–13.
 67. Zoete V. Molecular recognition , docking and drug design Molecular recognition , docking and drug design Molecular recognition , docking and drug design Molecular recognition [Internet]. 2008. p. 1989–90. Available from: https://embnet.vital-it.ch/CoursEMBnet/Pages3D08/slides/DD_v04.pdf
 68. Timm M, Saaby L, Moesby L, Hansen EW. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology.* 2013;65(5):887–94.
 69. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(12):1600–3.
 70. Nasreen noshinnasreen N, Semmar nabilsemmar N, Farmanfarman M, Saud Ahmad

- saudahmad N. MDPI MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences Employment of hyphenated approach for metabolomics fingerprinting of phenolics from *Torilis leptophylla* roots. 2017;3. Available from: <http://sciforum.net/conference/mol2net-03>
71. Tao L, Tanzer JM, MacAlister TJ, Tao L, Tanzer JM. Transformation Efficiency of EMS-induced Mutants of *Streptococcus mutans* of Altered Cell Shape. *J Dent Res*. 1993;72(6):1032–9.
72. NCPF. National collection of pathogenic Fungi [Internet]. 1986 [cited 2020 Sep 5]. Available from: https://www.phc-culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCPF_3179&collection=ncpf
73. Chen L, Jia L, Zhang Q, Zhou X, Liu Z, Li B, et al. A novel antimicrobial peptide against dental-caries-associated bacteria. *Anaerobe* [Internet]. 2017;47:165–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.016>
74. Esberg A, Sheng N, Mårell L, Claesson R, Persson K, Borén T, et al. *EBioMedicine* *Streptococcus Mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine* [Internet]. 2017;24:205–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.027>
75. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem*. 2005;26(16):1701–18.
76. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2010;78(8):1950–8.
77. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and Testing of a

- General Amber Force Field. *J Comput Chem.* 2004;56531(9):1157–74.
78. Sousa Da Silva AW, Vranken WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res Notes.* 2012;5:1–8.
79. Troffer-Charlier N, Ogier J, Moras D, Cavarelli J. Crystal structure of the V-region of streptococcus mutans antigen I/II at 2.4 Å resolution suggests a sugar preformed binding site. *J Mol Biol.* 2002;318(1):179–88.
80. Nylander Å, Forsgren N, Persson K. Structure of the C-terminal domain of the surface antigen SpaP from the caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2011;67(1):23–6.
81. Tardif S, Cormier N. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: A species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(11):661–8.
82. Lee JG, Youn HS, Kang JY, Park SY, Kidera A, Yoo YJ, et al. Crystal structure of the Ube2K/E2-25K and K48-linked di-ubiquitin complex provides structural insight into the mechanism of K48-specific ubiquitin chain synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;506(1):102–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.067>
83. Kim SJ, Cho J, Song EJ, Kim SJ, Kim HM, Lee KE, et al. Structural basis for ovarian tumor domain-containing protein 1 (otu1) binding to p97/valosin-containing protein (vcp). *J Biol Chem.* 2014;289(18):12264–74.
84. Yang M, Gocke CB, Luo X, Borek D, Tomchick DR, Machius M, et al. Structural Basis for CoREST-Dependent Demethylation of Nucleosomes by the Human LSD1 Histone Demethylase. *Mol Cell.* 2006;23(3):377–87.
85. Miyanohara M, Imai S, Okamoto M, Saito W, Nomura Y, Momoi Y, et al. Distribution of *Streptococcus troglodytae* and *Streptococcus dentirosetti* in chimpanzee oral cavities.

- Microbiol Immunol. 2013;57(5):359–65.
86. Zhang M, Yan L, Zhu G, Holifield M, Todd D, Zhang S. *Streptococcus troglodytidis* sp. nov., isolated from a foot abscess of a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(PART2):449–53.
 87. Cristensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3520–3.
 88. Copeland A, Sikorski J, Lapidus A, Nolan M, Del Rio TG, Lucas S, et al. Complete genome sequence of *Atopobium parvulum* type strain (IPP 1246 T). *Stand Genomic Sci*. 2009;1(2):166–73.
 89. Mavrommatis K, Pukall R, Rohde C, Chen F, Sims D, Brettin T, et al. Complete genome sequence of *Cryptobacterium curtum* type strain (12-3 T). *Stand Genomic Sci*. 2009;1(2):93–100.
 90. Casarin RCV, Saito D, Santos VR, Pimentel SP, Duarte PM, Casati MZ, et al. Detection of *Mogibacterium timidum* in subgingival biofilm of aggressive and nondiabetic and diabetic chronic periodontitis patients. *Brazilian J Microbiol*. 2012;43(3):931–7.
 91. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Sep 18];2(14):1–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 92. Ho D, Ang G, Er C, Yap SF, Meyyur Aravamudan V. An Unusual Presentation of *Parvimonas micra* Infective Endocarditis. *Cureus*. 2018;10(10).
 93. Chaucer B, Smith N, Beatty D, Yadav M. Multiple Hepatic Abscess from *Parvimonas*

- micra: An Emerging Gastrointestinal Microbe. *ACG Case Reports J.* 2018;5(1):e70.
94. Lyhs U, Kulkas L, Katholm J, Waller KP, Saha K, Tomusk RJ, et al. *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, Northern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(12):2097–103.
 95. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* 2018;13(8):915–32.
 96. Vacca-Smith AM, Jones CA, Levine MJ, Stinson MW. Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(6):2187–94.
 97. Uçkay I, Rohner P, Bolivar I, Ninet B, Djordjevic M, Nobre V, et al. *Streptococcus sinensis* endocarditis outside Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1250–2.
 98. Whiley RA, Freemantle L, Beighton D, Radford JR, Hardie JM, Tillotsen G. Isolation, identification and prevalence of *Streptococcus anginosus*, s. *Intermedius* and *S. Constellatus* from the human mouth. *Microb Ecol Health Dis.* 1993;6(6):285–91.
 99. Whiley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the “*Streptococcus milleri* group.” *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1497–501.
 100. Masood U, Sharma A, Lowe D, Khan R, Manocha D. Colorectal cancer associated with *Streptococcus anginosus* bacteremia and liver abscesses. *Case Rep Gastroenterol.* 2016;10(3):769–74.
 101. Hasegawa N, Sekizuka T, Sugi Y, Kawakami N, Ogasawara Y, Kato K, et al. Characterization of the pathogenicity of *Streptococcus intermedius* TYG1620 isolated from a human brain abscess based on the complete genome sequence with transcriptome analysis

- and transposon mutagenesis in a murine subcutaneous abscess model. *Infect Immun.* 2017;85(2):1–15.
102. Moschioni M, Pansegrau W, Barocchi MA. Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microb Biotechnol.* 2010;3(4):370–88.
103. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Deivanayagam CC, Jenkinson HF. NIH Public Access. 2011;77(2):276–86.
104. Cassels FJ, Hughes C V., Nauss JL. Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains. *J Ind Microbiol.* 1995;15(3):176–85.
105. Heim KP, Crowley PJ, Long JR, Kailasan S, McKenna R, Brady LJ. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of streptococcus mutans adhesin p1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(44):15711–6.
106. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr Top Med Chem [Internet].* 2014;14:1923–38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443793/pdf/CTMC-14-1923.pdf>
107. Gazgalis D, Zaka M, Zaka M, Abbasi BH, Logothetis DE, Mezei M, et al. Protein Binding Pocket Optimization for Virtual High-Throughput Screening (vHTS) Drug Discovery. *ACS Omega.* 2020;5(24):14297–307.
108. Ramírez D, Caballero J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? *Molecules.* 2018;23(5):1–17.
109. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al.

- GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):36–42.
110. Dukka BKC. Structure-based Methods for Computational Protein Functional Site Prediction Abstract : Due to the advent of high throughput sequencing techniques and structural genomic projects , the number of gene and protein sequences has been ever increasing . *Comput. Comput Struct Biotechnol* [Internet]. 2013;8(11):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201308005>
 111. Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. Analyzing the Topology of Active Sites : On the Prediction of Pockets and Subpockets. 2010;2041–52.
 112. Srinivasan N, Chandra N, Bhagavat R, Sankar S, Srinivasan N, Chandra N. An Augmented Pocketome : Detection and Analysis of Small-Molecule Binding Pockets in Proteins of Known 3D Structure Resource An Augmented Pocketome : Detection and Analysis of Small-Molecule Binding Pockets in Proteins of Known 3D Structure. *Struct Des* [Internet]. 2018;26(3):499-512.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.02.001>
 113. Volochnyuk DM, Ryabukhin S V, Moroz YS, Savych O, Chuprina A, Horvath D, et al. Evolution of commercially available compounds for HTS. *Drug Discov Today* [Internet]. 2019;24(2):390–402. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.10.016>
 114. Kennedy T. Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discov Today* [Internet]. 1997;2(10):436–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01099-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01099-4)
 115. Bocci G, Carosati E, Vayer P, Arrault A, Lozano S, Cruciani G. ADME-Space: A new tool for medicinal chemists to explore ADME properties. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):25–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06692-0>
 116. Schuster D, Laggner C, Langer T. Why Drugs Fail – A Study on Side Effects in New

- Chemical Entities. 2008;239–308.
117. McNaughton R, Huet G, Shakir S. An investigation into drug products withdrawn from the EU market between 2002 and 2011 for safety reasons and the evidence used to support the decision-making. *BMJ Open*. 2014;4(1):1–6.
 118. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res*. 2010;24(2):135–41.
 119. Nassar HM, Li M, Gregory RL. Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(2):536–40.
 120. Radmerikhi S, Formantes B, Fajardo KR, Azul E. Antimicrobial effect of different xylitol concentrations on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* count. 2013;95–8.
 121. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017;44:S5–11.
 122. Camelo-Castillo A, Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2014;64(Pt 1):60–5. Available from: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.054098-0>
 123. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytom Part A*. 2011;79 A(6):405–25.
 124. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011;(50):3–6.
 125. Scharnow AM, Solinski AE, Wuest WM. Targeting: *S. mutans* biofilms: A perspective on

- preventing dental caries. *Medchemcomm*. 2019;10(7):1057–67.
126. Burgos-Morón E, Calderón-Montaña JM, Salvador J, Robles A, López-Lázaro M. The dark side of curcumin Estefani´a. *Int J Cancer*. 2010;126:1771–5.
127. Cianfruglia L, Minelli C, Laudadio E, Scirè A, Armeni T. Side effects of curcumin: Epigenetic and antiproliferative implications for normal dermal fibroblast and breast cancer cells. *Antioxidants*. 2019;8(9):1–13.
128. Yang JY, Lee HS. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of morin isolated from mulberry fruits (*Morus alba* L.). *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2012;55(4):485–9.

