

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE α -GALACTOSIDASA EN SALIVA Y SU RELACIÓN CON LA EXPERIENCIA DE CARIES DENTAL

Clara María Arango Lince,¹ John Santiago Mejía Tobón,²

¹Odentóloga CES, Trabajo para optar título en Odontopediatría y ortodoncia preventiva.

²Médico CES, Master en Ciencias Básicas.

RESUMEN. Arango, C.M., Mejía, J.M. *Determinación de la actividad de α -galactosidasa en saliva y su relación con la experiencia de caries dental.* CES Odont 1997;10: El proceso de colonización depende del mecanismo de adherencia que utilicen las bacterias a la película dental, uno de los principales mecanismos de interacción es la interacción con ligandos de naturaleza sacarídica presentes en las glicoproteínas de la película adquirida. Algunas de las bacterias más relacionadas con el evento cariogénico como el St.mutans han mostrado presencia de lectinas para residuos de galactosa. La expresión de estos residuos de galactosa en la película adquirida puede verse modulada por la presencia en saliva de enzimas como la galactosidasa. En base a esto se procedió a evaluar la relación de la experiencia de caries dental con la actividad de la enzima galactosidasa en saliva. Muestras de 26 niños entre 4 y 18 años con diferente experiencia de caries (alta o baja) fueron procesadas mediante método indirecto con el disacárido melibiososa como sustrato y la lectina jacalina como lectora de los residuos de galactosas. Los resultados muestran una relación entre la alta actividad de la enzima galactosidasa en saliva y la baja experiencia de caries dental para dientes permanentes. No se encontró asociación para dientes deciduos.

Palabras clave: α -Galactosidasa, Caries.

ABSTRACT. Arango, C.M., Mejía, J.M. *α -Galactosidase activity in saliva and its relation to dental caries experience.* CES Odont 1997;10. Considerable evidence indicates that oral streptococci may interact with salivary components in a highly specific manner. Since a galactosa specific lectin has been indentified in St.mutans, it might be tought that α -galactosidase enzyme could modulate attachmentof galactose residues to the acquired pellicle, interferring with bacterial adsortion. Our purpose was to search for possible association between α -galactosidaseactivity and dentalcaries experience. 26 samples of 4 to 18 years old children with different dental caries experience levels were processed. α -galactosidase activity was detected using a specific idirect method with melibiose as a sustrate and jacalin lectin was used to bind terminal galactoses. Results showed relation between high α -galactosidase activity and low caries experience for permanent teeth. No relation was found for primary teeth.

Key words: α -Galactosidase, Caries.

INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.

A pesar de que la caries es una patología multifactorial en cuya etiopatogenia participan factores nutricionales, genéticos, microbiológicos, socioeconómicos y culturales¹, su desarrollo depende básicamente de la colonización de las estructuras dentales por bacterias patógenas².

Uno de los factores iniciales que intervienen en este proceso de colonización son los relacionados con la adherencia de las bacterias a las glicoproteínas de la película dental. Interacciones como fuerzas electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas, interacciones mediadas por fimbrias y fibrillas y puentes de hidrógeno se conocen como mecanismos no específicos de adherencia bacteriana. Mientras que interacciones estereoquímicas que involucran sitios específicos de reconocimiento como lectinas, adhesinas son considerados adhesiones específicas³. Ambos mecanismos de adherencia se han visto involucrados en el anclaje de bacterias a la película dental², sin embargo los autores han concluido⁴ que son las interacciones específicas de adhesina - receptor las que incrementan en mayor magnitud la fuerza de adherencia y dan la significancia ecológica a la colonización.

Child and Gibbons^{5,6} aseveraron en 1988 que algunas enzimas destruyen receptores para algunas bacterias, creando a su vez criptoepítopes para otras. Así, Levine y col⁷

mostraron que 2 de 4 glicoproteínas purificadas agragaban cepas de *St.sanguis* y *St.mutans*. La remoción del ácido siálico terminal de estas glicoproteínas mediante tratamiento con la enzima neuraminidasa interrumpió la agregación de *St.sanguis* pero no la de *St.mutans*. Tratamiento adicional con la enzima galactosidasa abolió la adhesión de *St.mutans*, confirmando la presencia de una lectina con una especificidad para residuos de galactosa en la superficie de esta bacteria.

Es necesario estudiar el proceso fisiopatológico que determina el desarrollo de la caries dental para poder diseñar nuevas estrategias de control.

La adherencia del *St.mutans* a la película dental adquirida es mediada por lectinas con especificidad para residuos de galactosa y por lo tanto los eventos que facilitan la expresión de estos residuos de galactosa en la película facilitan la colonización por estas bacterias patógenas⁸. La expresión de residuos de galactosa en la película adquirida puede ser modulada por galactosidasas salivares; en base a esto se hace necesario evaluar su actividad en saliva de pacientes con alta o baja experiencia de caries, y así establecer una correlación entre estas variables.

La presencia de una lectina específica para ácido siálico en *St.sanguis*⁷, y de una lectina específica para galactosa en *St.mutans* permite postular que la modulación del nivel de sialilización de las glicoproteínas salivares determina el tipo de colonización de la película adquirida por bacterias con diferentes características de patogenicidad. Igualmente es posible postular que la actividad de galactosidasa en saliva podría alterar la colonización bacteriana de la biopelícula, sugiriendo una menor actividad cariogénica por falta de receptores para bacterias patógenas del tipo *St.mutans* y otras bacterias con afinidad para la galactosa.

Este trabajo estudió la posible relación de la actividad de la enzima galactosidasa según el comportamiento de la experiencia de caries dental (Índices COP-D y ceo-d) por grupos de edad.

MATERIALES Y METODOS.

Estudio descriptivo transversal. Se seleccionó una muestra no probabilística de 26 niños entre 4 y 18 años con discapacidad mental leve o moderada pertenecientes a 2 instituciones de educación especial (Alamos y Renacer).

La estandarización para la aplicación de los índices de COP-D (Klein y Palmer) y ceo-d (Gruebel) fue realizada en escolares que asisten a CES Sabaneta con edades comprendidas entre los 5 y 12 años (n: 15 pacientes). Se obtuvo concordancia entre el examinador patrón y el investigador con un error = 0 (< 6 es el límite de rechazo según los parámetros del S.S.S.A.)

Los niños fueron distribuidos por el investigador según los diferentes niveles de caries dental en 2 grupos, grupo 1 con índice COP-D entre 0 y 2 (catalogado como de baja experiencia de caries) y grupo 2 con índice COP-D de 3 o más (Catalogado como de alta experiencia de caries).

La misma clasificación fue aplicada para el índice ceo-d.

Recolección y Procesamiento de las Muestras de Saliva.

El total de niños sujetos a toma de muestra de saliva fueron 26 niños (13 pertenecientes a Los Alamos y 13 pertenecientes a Renacer).

Todas las muestras de saliva se obtuvieron mediante jeringa desechable de 1ml por el método sugerido por Sceenby⁹. Se tomó saliva no estimulada en las horas de la mañana a todos los niños y se almacenó en tubos de microcentrífuga herméticamente sellados. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al centro de investigación básica del CES, donde se realizó una dilución de la muestra de 1 :2 en amortiguador de fosfato salino (PBS) a un pH de 7.2 para disminuir la viscosidad salivar. Se incubó durante 1 hora y se centrifugó 5 minutos para remover las células de descamación y detritos. Se recolectaron 400 μ Lt. del sobrenadante para cada muestra y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para detectar la actividad de α -galactosidasa se utilizó un método indirecto donde se mezclaron 100 μ Lt. de saliva con 40 μ Lt. del disacárido melibiosa (6- α -D-Galactopiranosil-D-Glucopiranosido)¹⁰ inmovilizado en una matriz de agarosa y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las pepitas de la combinación saliva-melibiosa se lavaron 2 veces con PBS, una vez con detergente iónico SDS (Dodecyl Sulfato de Sodio) al 1% en PBS y una vez más con PBS.

La incubación con SDS se realizó con el fin de remover las glicoproteínas salivares que pudieran haberse absorbido a la superficie durante la incubación

Posteriormente se agregó 100 μ Lt. de la lectina Jacalina biotinilada a una concentración de 5 μ gm/mLt. en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La lectina se obtuvo de la compañía PIERCE (Rockford, Illinois, U.S.A.). Se lavaron las pepitas 2 veces con PBS y se incubaron con avidina a una concentración de 5 μ gm/mLt. durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 2 veces con PBS se agregaron 100 μ Lt. de peroxidasa biotinilada a una concentración de 5 μ gm/mLt. durante 1 hora. La reacción enzimática se desarrolló en presencia de 4 Cloronaftol a una concentración de 600 μ gm/mLt. y en presencia de peróxido de hidrógeno al 0.03%.

La gran afinidad de la lectina biotinilada Jacalina por la neutrabidina permitió detectar la presencia de galactosas terminales residuales después de ocurrida la reacción, esto se hizo posible por medio de la reacción colorimétrica del cloronaftol en presencia del peróxido de hidrógeno y la lectura fue realizada por 3 especialistas en el tema con una concordancia del 100%.

Los parámetros establecidos para la clasificación de los resultados se hicieron de acuerdo a 4 categorías definidas así:

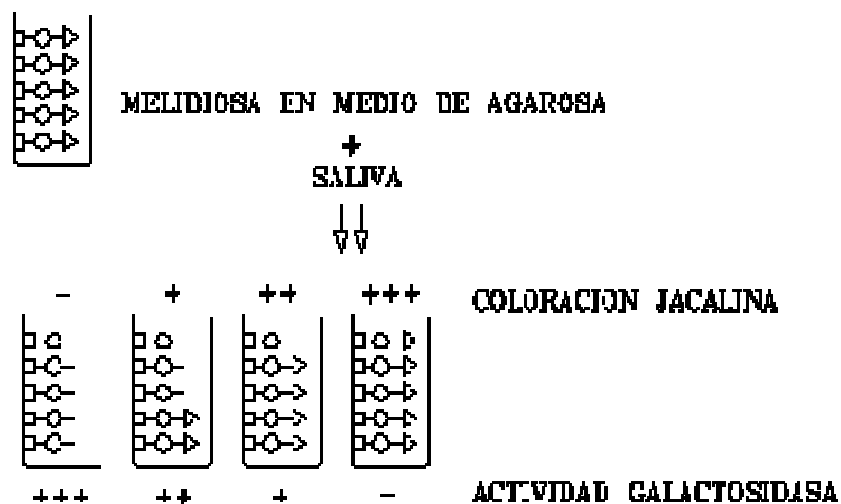
- : ausencia de tinción para galactosas terminales.
- + : Leve tonalidad morado claro.
- ++ : Tinción moderada al morado de carácter moteado.

+++ : Patrón francamente oscuro de tinción morado homogéneo.

De esto se dedujo que salivas con coloración fuerte (+++) o moderada (++) tenían la mayor cantidad de galactosas terminales, permitiendo concluir la baja actividad de enzima galactosidasa (BAG).

De igual forma, salivas con coloración nula (-) o leve (+) no presentaban galactosas terminales o las había en poca magnitud, permitiendo concluir la alta actividad de galactosidasa (AAG) en estas salivas. Ver esquema 5.

ESQUEMA 5. ACTIVIDAD DE GALACTOSIDASA



Plan de Tabulación y Análisis de la Información.

Para el análisis de la información se utilizó el programa Epi-Info 6.0. Se hizo un primer análisis bivariado de los datos para identificar la distribución proporcional de los niños examinados, según el comportamiento de la experiencia de caries dental en dientes permanentes y deciduos y la actividad de la enzima α -galactosidasa por grupos de edad.

Posteriormente, se exploró la relación entre la experiencia de caries y la actividad de la enzima a través de una prueba exacta de Fisher.

Para efectos del análisis en tablas de contingencia se dicotomizaron las variables relacionadas con caries dental en dientes permanentes y deciduos y actividad de enzima galactosidasa.

De la totalidad de la muestra (26 niños), un niño no presentaba dentición permanente y 12 niños no presentaban dentición decidua, lo que redujo la muestra final analizada para las variables de experiencia y prevalencia de caries a 25 y 14 niños respectivamente.

RESULTADOS.

Las edades de los integrantes del estudio oscilaron entre 4 y 18 años con un promedio de 12 años.

Los índices de experiencia de caries COP y ceo-d que evalúan la experiencia de caries dental en dientes permanentes y deciduos fueron dicotomizados en 2 grupos, un primer grupo denominado de "baja experiencia de caries dental" con índices de COP entre 0 y 2, y un segundo grupo de "alta experiencia de caries dental" con índices de 3 o más.

La experiencia de caries en dientes permanentes (COP) según la edad no muestra una tendencia clara; una alta experiencia de caries está presente en el 40% de los niños de 4 a 8 años, en el 62% de los niños de 9 a 13 años y en el 25% de los niños de 14 a 18 años.

La prevalencia de caries en dientes permanentes (dientes cariados) según la edad mostró que el 40% de los niños entre 4 y 8 años tenían alta prevalencia de caries dental (3 o más dientes cariados). En el grupo de 9 a 13 años y 14 a 18 años este indicador era 37.5% y 16.7%, respectivamente.

Al analizar la experiencia de caries dental en dientes deciduos según grupos de edad se encontró que de la totalidad de los niños con edades entre 4 a 8 años y 9 a 13 años, el 66.7% y el 33.3% respectivamente, tenían alta experiencia de caries. Debido a que el grupo de edad de 14 a 18 años no presenta dentición decidua, no se tomó en cuenta este grupo de edad para el ceo.

Para el análisis de la actividad de galactosidasa se midió indirectamente la capacidad de adherencia de ésta enzima a la lectina Jacalina. Al analizar la distribución de frecuencias para la actividad de enzima galactosidasa se encontró que el 38.5% de los niños mostraron alta actividad de la enzima (Jacalina con pigmentación nula o leve), mientras que el 61.5% mostraron baja actividad de la enzima. (Jacalina con pigmentación moderada o fuerte).

Cuando se mira la actividad de la enzima al interior de cada uno de los grupos de edad se puede destacar que un gran porcentaje de los niños del grupo de 9 a 13 años presentaban una baja actividad de galactosidasa (BAG), así mismo este grupo de edad fue el que presentó el mayor porcentaje de experiencia de caries dental en dientes permanentes (42.9%).

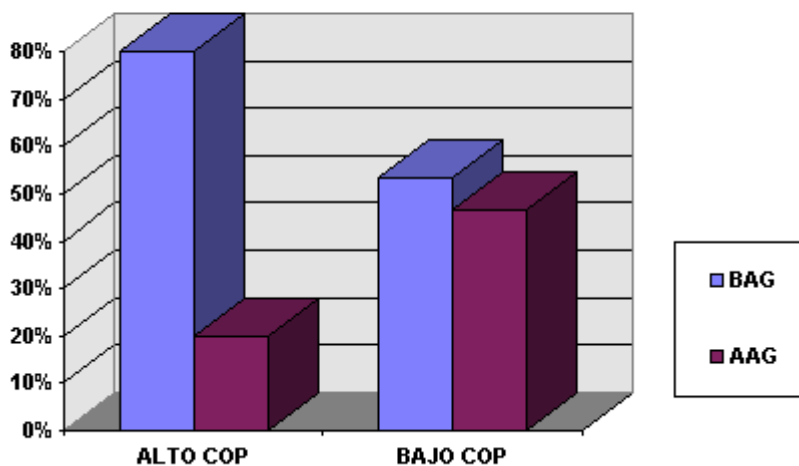
Al explorar la relación de la actividad de la enzima galactosidasa con la experiencia de caries dental en dientes permanentes (COP) se encontró que de la totalidad de niños con alta experiencia de caries en dientes permanentes (10 niños), el 20% presentaba AAG, mientras que el 80% restante presentaba BAG. La distribución para la baja experiencia de caries en dientes permanentes no mostró diferencias, pues de los niños con baja experiencia de caries, el 46.7% tenían AAG y el 53.3% tenían BAG. El análisis de la relación entre la experiencia de caries en dientes permanentes y la actividad de la enzima galactosidasa no arrojó diferencia estadísticamente significativa (P: 0.17). Ver tabla 1 y gráfico 7.

TABLA 1. DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE NIÑOS SEGÚN COP Y ACTIVIDAD DE GALACTOSIDASA. 1996.

ACTIVIDAD DE ENZIMA	BAG		AAG		TOTAL	
	#	%	#	%	#	%
EXPERIENCIA DE CARIES						
ALTO COP	8	80%	2	20%	10	100%
BAJO COP	8	53.3%	7	46.7%	15	100%

Test exacto de Fisher.
Valor de P: 0.17

GRÁFICO 7. DISTRIBUCIÓN PROPORCIONAL DE NIÑOS SEGÚN ACTIVIDAD DE GALACTOSIDASA Y COP. 1996.



Al correlacionar la prevalencia de caries en dientes permanentes con la actividad de galactosidasa se encontró que de la totalidad de niños con alta prevalencia de caries en dientes permanentes el 28.6% presentaban AAG y el 71.4% restante presentaban BAG. No se encontró significancia estadística (P: 0.50). Ver tabla 2.

TABLA 2. DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE NIÑOS SEGÚN PREVALENCIA DE CARIES EN DIENTES PERMANENTES Y ACTIVIDAD DE ENZIMA GALACTOSIDASA. 1996.

ACTIVIDAD ENZIMA	BAG		AAG		TOTAL	
	#	%	#	%	#	%

ALTA PREVALENCIA	5	71.4%	2	28.6%	7	100%
BAJA PREVALENCIA	11	61.1%	7	38.9%	18	100%
Test exacto de Fisher Valor de P: 0.50						

Al analizar la relación entre la experiencia de caries en dientes deciduos y la actividad de la enzima galactosidasa no se observaron diferencias importantes.

DISCUSION.

En la etiopatogenia de la caries dental es fundamental la interacción permanente entre la superficie dental y las moléculas presentes en la saliva. Algunas de estas moléculas salivares se adsorben dinámicamente a la superficie dental, formando la película adquirida. Esta película es otra superficie que facilita o evita la adsorción de otras moléculas solubles o asociadas a microorganismos; por lo tanto las modificaciones estructurales de la película adquirida pueden tener gran efecto sobre la flora microbiana que forman.

El estudio de Díaz en 1996¹¹ demostró la existencia en saliva de moléculas complejas que se adsorbieron a superficies artificiales salivadas. Entre las moléculas, las galactosas fueron las de mayor expresión en las porciones terminales de las glicoproteínas adheridas a las superficies.

Entre las enzimas que pueden modificar las glicoproteínas en la superficie de la película se encuentran la galactosidasa. El efecto de la galactosidasa sobre la película adquirida podría ser particularmente atractivo en la etiología de la caries debido a que en bacterias patógenas como *St.mutans* se ha reconocido una lectina con especificidad por residuos de galactosa^{12, 7, 13}. A pesar de que no se puede asegurar que la actividad de la enzima en saliva sea la misma que en película adquirida, no hay razón para pensar que la galactosidasa no actúe sobre los residuos de galactosa terminales disponibles sobre la película.

Aquel individuo que tenga baja actividad de galactosidasa en saliva tendrá mayor densidad de residuos de galactosas terminales asociados a la película adquirida, y en consecuencia es posible que BAG signifique un factor de riesgo para caries dental ya que microorganismos como *St.mutans*, *A.naeshlundi*, entre otros, encontrarían mayor cantidad de criptoepítopes que facilitarían su adherencia a la película adquirida. Igualmente, una alta actividad de galactosidasa en saliva podría actuar como un factor protector contra la caries dental ya que la cantidad de sitios receptores para microorganismos patógenos se vería disminuida.

El análisis de los resultados mostró relación entre alta actividad de enzima galactosidasa y baja experiencia de caries para dientes permanentes, lo cual sugiere a la enzima

galactosidasa como un posible factor protector contra la caries en dientes permanentes. Sin embargo no se encontró asociación para dientes deciduos. Estos hallazgos demuestran la necesidad de continuar explorando la actividad de esta enzima en boca; y no solo es importante enfocar todos los esfuerzos hacia su posible modulación en el proceso de caries dental. También sería interesante realizar estudios que continúen investigando la relación de estas enzimas con la enfermedad periodontal como lo hizo el estudio de Beighton en 1992, en el que se encontró asociación con enfermedad periodontal.

Es interesante acerca de este estudio el que se haya logrado detectar actividad de enzima galactosidasa trabajando con muestras de saliva no purificada, y en presencia de microorganismos, otras enzimas como proteasas y glicoproteínas propias del medio salivar; ya que esta situación semeja mucho la realidad de la cavidad oral. Por lo tanto se podría sugerir que la enzima galactosidasa se encuentra no solo presente como lo relatan diversos estudios, sino en actividad en algunos individuos. Es importante considerar la importancia de continuar investigando el comportamiento de este tipo de glicosidasas y su posible papel modulador en diferentes patologías como se mencionó anteriormente.

Aunque la metodología utilizada se basó en la detección indirecta de actividad de la enzima, la especificidad tanto del sustrato como de la lectina ya han sido demostrados experimentalmente y comúnmente utilizados en la purificación de lectinas. Es innovador la utilización de este tipo de metodología para el reconocimiento de actividad enzimática en saliva y podría ser de aplicabilidad para el estudio de diferentes moléculas y enzimas de la saliva con las modificaciones pertinentes para sus respectivos sustratos. Luego de una extensa revisión de la literatura no se encontró ningún estudio que utilizara una metodología similar pues la gran mayoría de los autores^{7, 8, 13, 14} han concentrado sus esfuerzos en trabajar con glicoproteínas y enzimas purificadas (obtenidas de alguna casa comercial) lo cual, aunque trata de semejar el proceso de adherencia bacteriana, olvida la complejidad de las interacciones moleculares en la cavidad oral.

Existen métodos con mayor sensibilidad para detectar la presencia de glicosidasas, entre ellas la galactosidasa, mediante la técnica fluorométrica β -Methylumbelliferone que es un sustrato conocido como Coumarin 4, sin embargo su alto costo limita la aplicabilidad en nuestro medio.

Fue imposible realizar comparaciones ya que no se encontraron reportes similares que intentaran relacionar la actividad de la enzima galactosidasa y la experiencia de caries dental.

Es importante comprender que los factores específicos que se han analizado como parte del proceso etiopatogénico de la caries son solo un grano de arena para el avance en la investigación de los múltiples factores que intervienen como moduladores de la caries dental. No obstante, estas adhesiones específicas de adhesina-receptor parecen ser las que en última instancia brindan la significancia etiológica para la colonización bacteriana⁴.

Los hallazgos aquí encontrados generan nuevos interrogantes y son un punto de partida para el futuro establecimiento de asociaciones causales.

CONCLUSIONES.

Niveles altos de la enzima galactosidasa se sugieren como un posible factor protector contra la caries dental en dientes permanentes. Este hallazgo es un punto de partida para el reconocimiento de la importancia clínica que puede tener el comportamiento enzimático en la saliva de los diferentes individuos, ya que el entendimiento del proceso de adherencia bacteriana es la base para el diseño de medidas de control contra la caries dental.

BIBLIOGRAFIA.

1. Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD. Dental Caries, Aetiology, Pathology and Prevention. Londres, Macmillan Press LTD, 1981 : 4-7.
 2. Thylstrup A., Fejerskov O. Textbook of Clinical Cariology. Segunda edición. Copenhagen, Munksgaard, 1994 :421pp.
 3. Rutter PR, Dazzo FB, Fretter R, Gingell D, Jones GW, Kjellengerg SLA, Marshall KC, Mrozek H, Rades-Rohkohl E, Robb LD, Silverman M, and Tylewska S. Mechanism of adhesion. 1984. In: Dahlem Workshop on Microbial Adhesion and Aggregation, Marshall, KC. De. Berlín: Springer-Verlag: 5-19.
 4. Gibbons RJ, Etherden, I, and Moreno C.: Association of Neuraminidase-Sensitive Receptors and putative Hydrophobic Interactions with High Affinity Binding Sites for Streptococcus Sanguis C5 in Salivary pellicles. Infection and Immunity. 1983; 42:1006.
 5. Childs WC and Gibbons RJ. Use of Percoll Density Gradients for Studying the Attachment of bacteria to Oral Epithelial Cells. J Dent Res 1988; 67: 826-830.
 6. Childs WC and Gibbons RJ. Potential of Enzymatic Modification of Epithelial Cells to Modulate Attachment and Colonization of Gingival Bacteria. J Dent Res. 1988; 67 (Sp Iss) Abst.1404.
 7. Levine MJ, Herzberg MC, Levine MS, Ellison SA, Stinson MW, Li HC and Van Dick T. Specificity of Salivary Bacterial Interactions: Role of Terminal Sialic Acid and Residues in the Interaction of Salivary Glycoproteins with Streptococcus sanguis and Streptococcus Mutans. Infect Immun. 1978; 19: 107-115.
 8. Cassels FJ, Fales HM, London J, Carlson RW, Van Halbeek H. Structure of a Streptococcal Adhesin Carbohydrate Receptor. J-Biol-Chem. 1990; 265(24): 14127-35.
 9. Screenby LM. Salivary Flow in Health and Disease. Compend Contin Educ Dent, Suppl. N° 13. S461-S469. Gibbons RJ. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Disease. J Dent Res. 1989; 68(5): 750-760.
 10. Catalog of Fine Chemicals. Editorial Acrôs Organics. Pittsburg, P.A. 1995-1996.
 11. Diaz PI. Reconocimiento de Sacáridos presentes en películas Adquiridas de Origen salivar Formadas In Vitro Sobre superficies de Acrílico. Tesis Postgrado. CES. 1996pp.
 12. Gibbons, R. J. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Disease. J Dent Res. 1989; 68(5): 750-160.
 13. Doyle RJ, Nesbit WE and Taylor KG. On the Mechanism of the Adherence Streptococcus Sanguis to Hydroxiapatite. Federation of European Microbiological Societies microbiology letters 1982; 15:1.
 14. Liljemark WF and Schauer SV. Competitive Binding Among Oral streptococci to Hydroxiapatite. J Dent Res. 1977; 56: 157-165.
-