

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE NEURAMINIDASA Y PROTEASAS EN LA INSERCIÓN DE CIERTAS BACTERIAS PERIODONTOPATOGENICAS A PELICULAS SALIVARES EXPERIMENTALES

Gabriel J. Cadavid* y Ronald J. Gibbons**

Palabras claves: Adherencia, Saliva, Microbiología, Periodoncia.

Introducción:

Bajo condiciones normales, los dientes están cubiertos por una membrana transparente, llamada "película adquirida" la cual es formada por adsorción selectiva de los componentes salivales a la hidroxiapatita (HA) del esmalte. Esta película adquirida tiene varias funciones protectoras, que modulan la inserción de la bacteria en los estados iniciales de formación de placa.

Investigaciones anteriores han mostrado que esta etapa inicial de formación de placa dental es muy selectiva, y algunos microorganismos se adhieren mejor que otros. En la inserción de la bacteria a la superficie dental participan interacciones entre los componentes superficiales de los microorganismos y los constituyentes salivales. En el caso de algunas bacterias orales, esta interacción involucra componentes lectínicos de los microorganismos los cuales se unen a los receptores sacáridos en las glicoproteínas salivales formando la película.

Este trabajo estudia la adherencia de algunas bacterias asociadas con enfermedad periodontal a películas salivales experimentales, y también determina si esta inserción puede ser alterada por ciertas modificaciones enzimáticas como podría ocurrir con algunas enzimas derivadas del huésped en el medio ambiente gingival.

MATERIALES Y METODOS:

CULTIVOS Y CONDICIONES DEL CULTIVO:

Las cepas bacterianas usadas se obtuvieron de la colección de cultivos de el Forsyth Dental Center.

*Profesor Asistente Facultad de Odontología Instituto de Ciencias de la Salud.

**Forsyth Dental Center, Boston, MA, 02115

Streptococo sanguis C - 5 fue mantenido con Todd-Hewitt broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md), Actinomicos viscosus LY7 se cultivó en medio de tripticasa soy (BBL) y en cajas de trypticasa soy (BBL). Bacteroides gingivalis 381 y B intermedium 581 crecieron en medio de Todd-Hewitt suplementado con 5 μ g de Hemina y 0,2 μ g de menadiona por m.l. Actinobacilo actinomycetemcomitans (A.a.) y 4 se desarrolló en medio de Todd-Hewitt.

Todos los cultivos se incubaron a 35 grados centígrados en jarras anaeróbicas (Becton, Dickinson & Co., Rutherford, N.J.) con 80% de N₂, 10% de CO₂ y 10% H₂. Las bacterias fueron reactivadas con 3H thymidina en su respectivo medio añadiéndoles de 2 a 10 μ Ci de 3H thymidina por m.l. (New England Nuclear Corp., Boston MA.). Luego de cultivar las células en la noche los cultivos se centrifugaron y se lavaron tres veces en una suspensión con 0.05 M KCl con 1 mM de fosfato (pH = 6.0), 1 mM CaCL y 0,1 mM MgCL (KCl buffer).

PREPARACION DE LA SALIVA:

Se recogió saliva completa estimulada, con parafina, de un donante de 26 años usando un tubo embebido en hielo, luego la saliva se colocó a 60 grados centígrados por 30 minutos para inactivar las enzimas degradativas y fue clarificada por centrifugación a 10.000 x g por 10 minutos. (Clark, Gibbons 1977 Hay 1971). La saliva se congeló previamente a su uso.

ABSORCION BACTERIANA A LA HIDROXIAPATITA (HA).

Se usaron gránulos esféricos de HA (BDH Biochemicals Ltda. Poole, England) con un diámetro de 85 a 125 μ m y una área aproximada de 0,27 cm. Se colocaron 5,0 mg de los gránulos de HA en placas desechables de poliestireno (Dynatech Laboratories, Inc.). Los gránulos se colocaron en Hcl Buffer

durante la noche, luego se les colocó 125 μ L de saliva completa clarificada por una hora a temperatura ambiente en un aparato que rotaba continuamente por 10 veces cada minuto, luego los gránulos se lavaron dos veces con Kcl Buffer y se incubaron por una hora con Kcl Buffer más 5mg/ml. de albúmina humana (Sigma Chemical Co., ST. Louis, Mo.) para bloquear algunas zonas de la HA que no estaban cubiertas.

Los gránulos fueron sometidos a diferentes tratamientos enzimáticos; Neuraminidasa (Clostridril tipo X) fue disuelto en 0,05 M Buffer acetato a pH = 5,0; Trypsina dos veces cristalizada fue usada en 0,05 M HEPES ácido N-2 hydroxy-ethylpiperazina-N-2 ethanelsulfónico) a pH = 8,0. La papaina se usó en 0.05 M HEPES ácido N-2-hydroxy-ethylpiperazina-N-2 ethanelsulfónico) a pH = 6,0. Trypsina y papaina se estudiaron a diferentes concentraciones (100 μ g/ml. - 10 μ g/ml. 1 μ g/ml. Todas las enzimas se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

Luego del tratamiento con la enzima respectiva por 30 minutos, los gránulos se lavaron dos veces con Kcl Buffer y se incubaron con 125 μ L de la suspensión bacteriana con 3H thimidina. Esto estuvo en rotación continua (10 veces por minuto) a temperatura ambiente por 60 minutos; luego se tomó el líquido sobrenadante que contenía microorganismos no absorbidos a la hydroxyapatita, los gránulos se lavaron tres veces con Kcl Buffer y se pasaron a frascos de centello, y se contaron. Todas las pruebas se hicieron en duplicado y la mayoría de experimentos se hicieron al menos dos veces, el número de bacterias que se adherió a los gránulos de saliva-hidroxyapatita se determina por medio de el contador de centello (Clark 1978; Gibbons 1982).

RESULTADOS

ABSORCION BACTERIANA A LA SALIVA TRATADA CON HA:

Todas las diferentes cepas bacterianas se absorvieron diferentemente a la HA tratada con saliva (fig. 1). Actinomyces viscosus LY7 fue el que mayor adherencia presentó a este tipo de tratamiento, el Streptococo mitis C-5 se comportó de manera similar a el Actinomyces. A.a. y 4 fue la bacteria que menos se absorbió en todos los experimentos. Cepas de B. gingivalis 381 y B intermedium 581 presentaron menor adherencia que los Actinomyces Ly7 y S. mitis C-5, pero mayor inserción que A.a Y4 (Tabla 1).

TABLA 1 - Valores de adsorción bacteriana a la saliva tratada con Hidroxiapatita HA.

Cepa bacteriana Número de bacterias adheridas ($\times 10^6 \pm$ D.S) por 5 mgs de HA con saliva a 60 grados centígrados por 30 minutos.

<u>S. sanguis</u> C-5	4.8 \pm 0.4
<u>A. viscosus</u> LY7	5.2 \pm 0.6
<u>B. intermedium</u> 581	1.3 \pm 0.3
<u>B. gingivalis</u> 381	1.82 \pm 0.2
<u>A. actinomycetemcomitans</u> y 4	0.8 \pm 0.09

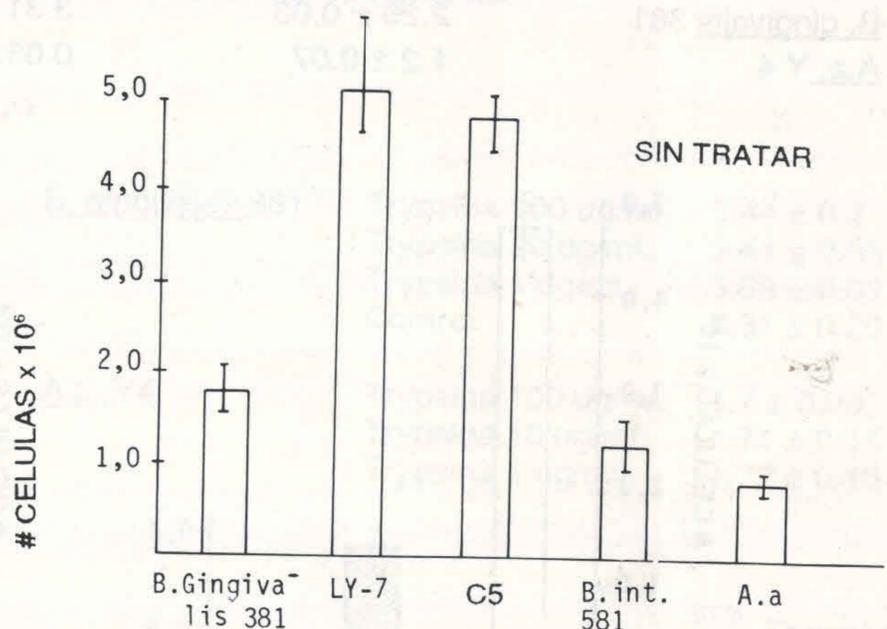


Figura 1 Adsorción bacteriana a saliva tratada con hidroxiapatita.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SALIVA -HA CON PREPARACIONES ENZIMATICAS SOBRE LA ABSORCION BACTERIANA.

La capacidad de la saliva de modificar y reducir la inserción de algunas bacterias asociadas con enfermedades periodontales sugiere que pueden haber enzimas en los fluidos orales que pueden destruir o alterar los receptores de la película para cambiar el patrón de inserción de algunos microorganismos.

En consecuencia, el efecto de tratar la saliva HA con algunas preparaciones comerciales enzimáticas y asociadas con enfermedad periodontal fue estudiada.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA:

Este tipo de tratamiento con películas salivares experimentales redujo inserción de el Streptococo mitis C-5 y el Actinomyces viscosus LY7, y tuvo un efecto ligeramente mayor sobre la adherencia de B. intermedium 581, B. gingivalis 381 y A.a. Y4 (figura 2 y tabla 2)

Tabla 2 - Efecto del tratamiento con Neuraminidasa de la saliva - HA en la adherencia bacteriana.

Cepa bacteriana	Número de bacterias adheridas (x 10 ⁶ ± D.S).	
	Neuraminidasa S - HA	Control S - HA
<i>S. sanguis</i> C-5	1.31 ± 0.17	4.53 ± 0.42
<i>A. viscosus</i> LY7	2.26 ± 0.12	4.38 ± 0.3
<i>B. Intermedius</i> 581	2.42 ± 0.08	1.20 ± 0.19
<i>B. gingivalis</i> 381	2.29 ± 0.03	3.31 ± 0.20
<i>A.a.</i> Y 4	1.2 ± 0.07	0.65 ± 0.01

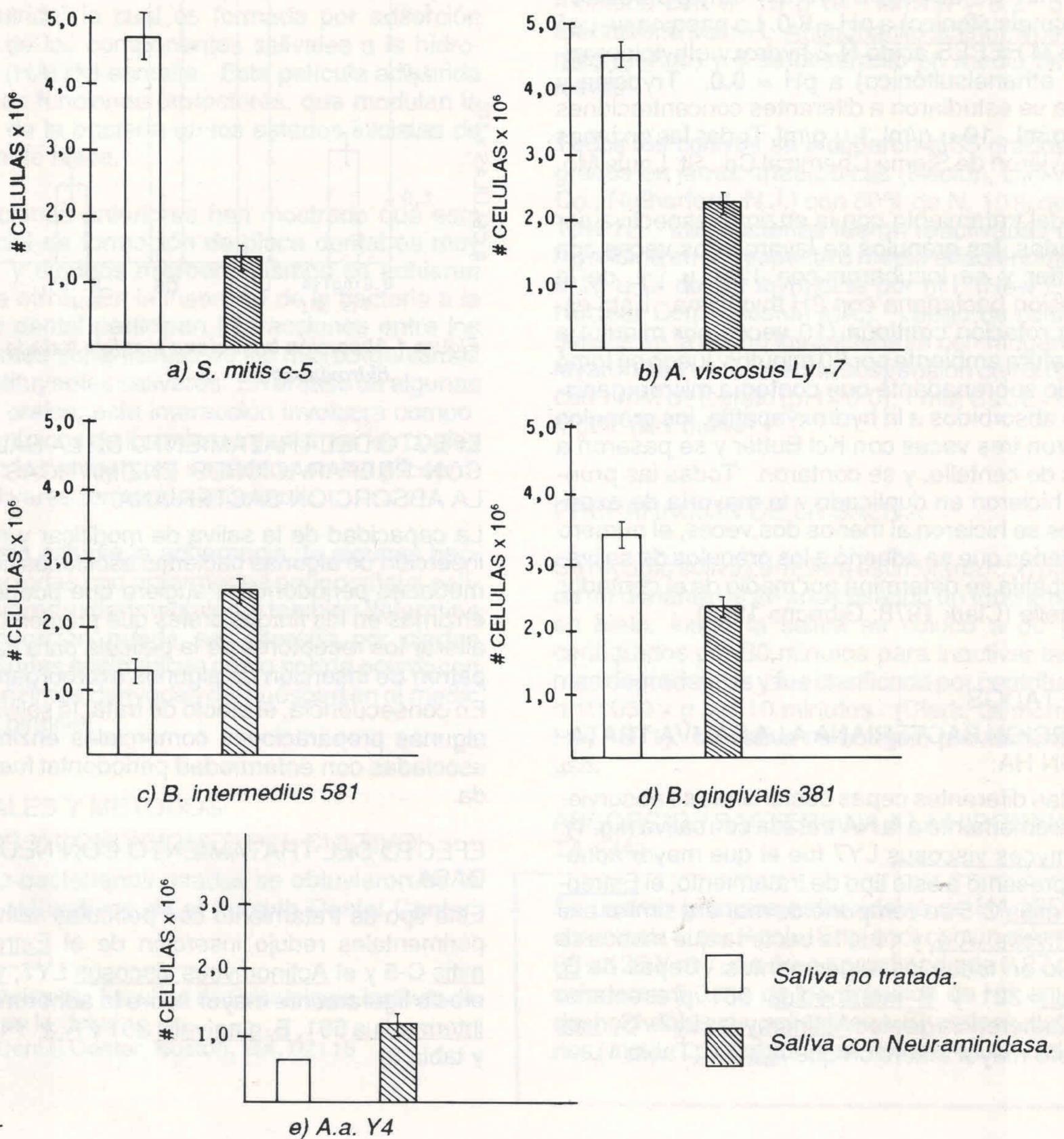


Figura 2 -

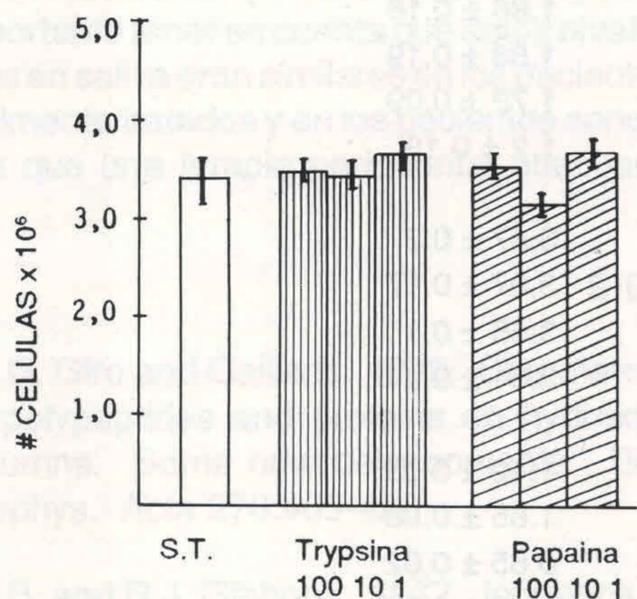
EFFECTO EN EL TRATAMIENTO CON TRYPSINA SOBRE LA ABSORCION BACTERIAL:

La adherencia de las bacterias a las películas tratadas con trypsin se estudió con tres concentraciones diferentes de la enzima (100 μ g/ml., 10 μ g/ml. 1 μ g/ml.) estos resultados fueron comparados con aquellos que se observaron en las películas no tratadas. Este tipo de tratamiento tienen un pequeño efecto promotor con *B. gingivalis* 381 y *B. interme-*

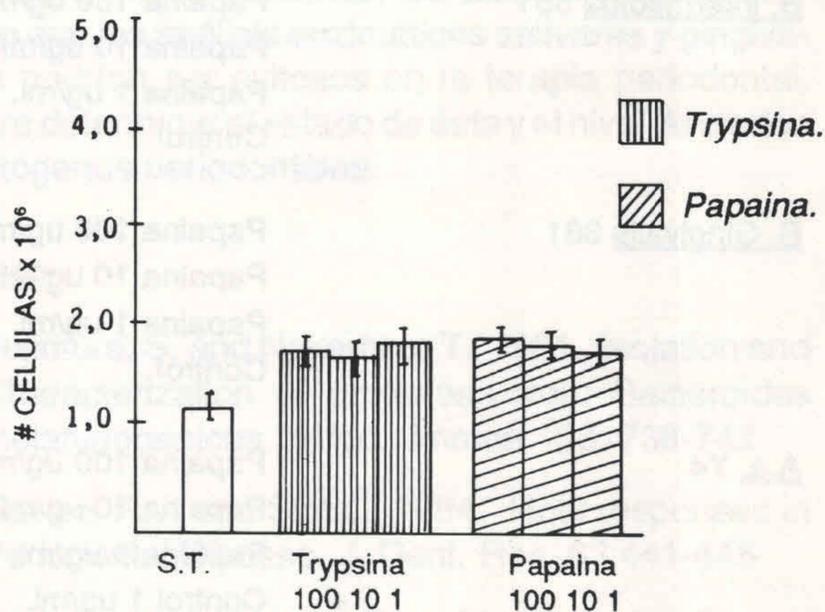
dius 581, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significantes. *A.a.* Y4 presentó un incremento en su adherencia con este tratamiento, pero no se observaron mayores diferencias en las diferentes concentraciones de Trypsina, tratamiento de saliva -HA con trypsin redujo la absorción de *Actinomyces viscosus* LY7 esta reducción fue casi las mismas con relación a las diferentes concentraciones de trypsin (fig. 3 y tabla 3).

Tabla 3 - Efecto del tratamiento con trypsin de la S-HA en la adherencia bacteriana.

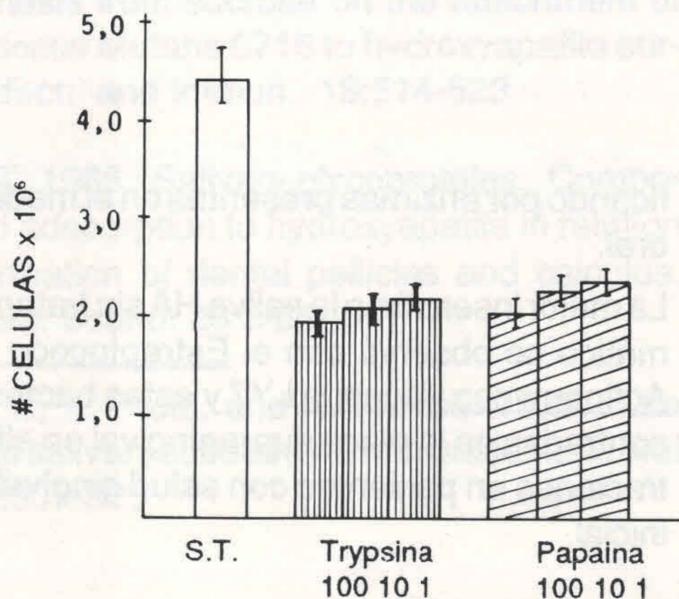
Cepa bacteriana	Número de bacterias adheridas (x 10 ⁶ ± D. S) tratamiento de la película.	
<i>A. viscosus</i> LY 7	Trypsina 100 μ g/ml.	1.73 ± 0.19
	Trypsina 10 μ g/ml.	1.68 ± 0.11
	Trypsina 1 μ g/ml.	1.75 ± 0.09
	Control	1.20 ± 0.19
<i>B. intermedius</i> 581	Trypsina 100 μ g/ml	1.73 ± 0.19
	Trypsina 10 μ g/ml	1.68 ± 0.11
	Trypsina 1 μ g/ml	1.75 ± 0.09
	Control	1.20 ± 0.19
<i>B. gingivales</i> 381	Trypsina 100 μ g/ml.	3.44 ± 0.2
	Trypsina 10 μ g/ml.	3.41 ± 0.03
	Trypsina 1 μ g/ml.	3.58 ± 0.03
	Control	3.31 ± 0.20
<i>A.a.</i> Y4	Trypsina 100 μ g/ml.	1.7 ± 0.09
	Trypsina 10 μ g/ml.	1.74 ± 0.11
	Trypsina 1 μ g/ml.	1.72 ± 0.10



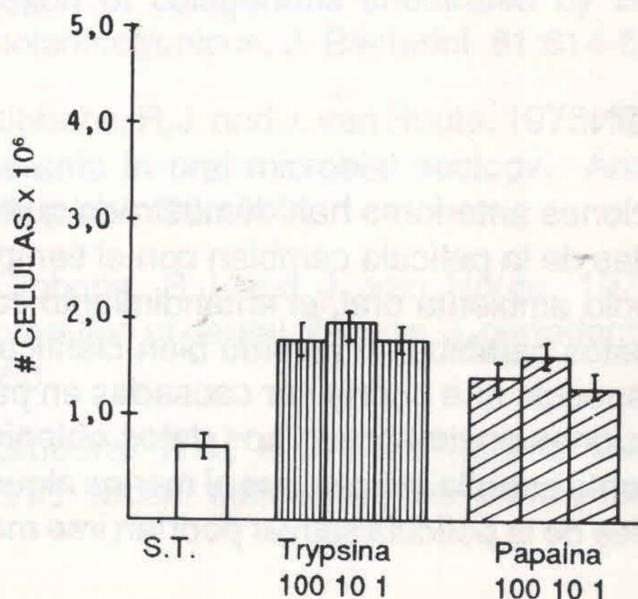
a) *B. Gingivalis* 381;



b) *B. Intermedius* 581;



c) *A. Viscosus* LY7



d) *A.A.* Y4.

Fig. 3. -

• EFECTO DE EL TRATAMIENTO CON PAPAINA SOBRE LA ABSORCION BACTERIAL:

Los resultados mostraron un ligero aumento en la adherencia de B. gingivalis 381, B intermedius 581 y A.a. Y4, pero no hubo significancia estadística.

Actinomyces viscosus LY7 tuvo una disminución en cuanto a su inserción.

El tratamiento con trypsin y papaina mostró casi los mismos resultados en las tres diferentes concentraciones con relación a la inserción (fig.3 y tabla 4).

Tabla 4 - Efecto del tratamiento con Papaina de la S-HA en la adherencia bacteriana.

Cepa bacteriana	Número de bacterias adheridas (x 10 ⁶ ± D.S)
Tratamiento de la película S-HA.	
<u>A. viscosus</u> LY7	Papaina 100 ug/ml. 2.13 ± 0.08
	Papaina 10 ug/ml. 2.26 ± 0.01
	Papaina 1 ug/ml. 2.37 ± 0.07
	Control 4.38 ± 0.30
<u>B. intermedius</u> 581	Papaina 100 ug/ml. 1.86 ± 0.16
	Papaina 10 ug/ml. 1.83 ± 0.19
	Papaina 1 ug/ml. 1.72 ± 0.09
	Control 1.2 ± 0.19
<u>B. Gingivalis</u> 381	Papaina 100 ug/ml. 3.47 ± 0.2
	Papaina 10 ug/ml. 3.07 ± 0.17
	Papaina 1 ug/ml. 3.55 ± 0.1
	Control 3.31 ± 0.2
<u>A.a.</u> Y4	Papaina 100 ug/ml. 1.42 ± 0.03
	Papaina 10 ug/ml 1.65 ± 0.08
	Papaina 1 ug/ml. 0.65 ± 0.02
	Control 1 ug/ml. 0.65 ± 0.02

DISCUSION:

Investigaciones anteriores han demostrado que las propiedades de la película cambian con el tiempo y con el medio ambiente oral, el entendimiento completo de estos cambios no ha sido bien clarificado, pero se especula que podría ser causadas en parte por alteraciones enzimáticas. Los datos obtenidos en el presente estudio indican que al menos algunas propiedades de la película salivar podrían irse modi-

ficando por enzimas presentes en el medio ambiente oral.

La mejor inserción a la saliva HA sin tratamiento enzimático se observó con el Streptococo mitis C-5 y Actinomyces viscosus LY7 y estas bacterias son encontradas en la placa supragingival en altas concentraciones en pacientes con salud gingival o gingivitis inicial.

Al contrario *B. gingivalis* 381, *B. intermedius* 581 y *A.a.* Y4 mostraron poca inserción a la saliva tratada con HA y estas bacterias se encontraron en proporciones importantes en la placa subgingival asociada con inflamación gingival, alteraciones en los componentes enzimáticos de el fluido gingival y/o diferentes tipos de enfermedad periodontal.

El tratamiento con diferentes enzimas relacionadas con enfermedad periodontal (Neuraminidasa, Trypsina y Papaina) no alteran en una forma muy importante la inserción de la bacteria, pero en el caso del *B. gingivalis* 381, *B. intermedius* y *A.a.* Y4 su inserción mostró un ligero incremento. (Fig. 2-3) mientras que la inserción del *A. viscosus* LY7 tuvo una disminución con todos los tratamientos enzimáticos estudiados.

Estudios anteriores han demostrado niveles altos de este tipo de enzimas en la saliva y fluido crevicular de pacientes adultos con periodontitis comparados con pacientes adultos sanos (Zambon et al 1985) también es importante tener en cuenta que estos niveles enzimáticos en saliva eran similares en los pacientes periodontalmente tratados y en los pacientes sanos, esto indica que una terapia periodontal adecuada

puede reducir las actividades enzimáticas específicas a un nivel casi normal.

Los microorganismos asociados con periodontitis probablemente aumenten ó ayuden a la polifерación de las enzimas salivares, las cuales son elevadas en pacientes no tratados con enfermedad periodontal.

Este estudio demuestra que la bacteria presenta adherencia específica basada en receptores moleculares para cada organismo y, en el caso de las enfermedades periodontales, como la inserción de algunos microorganismos puede ser modificada por alteraciones enzimáticas en su medio ambiente.

Los datos obtenidos sugieren que una modificación de los receptores en los tejidos del huesped por enzimas microbianas representan un nuevo tipo de interacción que afecta la ecología bacteriana oral.

Podemos concluir que el medio ambiente salivar y gingival en un paciente periodontal podría facilitar la adherencia de algunos microorganismos periodonto-patógenicos. Además, los datos anteriores indican que los análisis enzimáticos salivares y gingivales podrían ser exitosos en la terapia periodontal, para determinar el estado de ésta y el nivel de ciertos patógenos periodontales.

BIBLIOGRAFIA:

- Bernardi, G. Giro and Gaillard. 1972. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. Some new developments. *Biochim. Biophys. Acta* 278:409-420
- Clark, W. B. and R.J. Gibbons. 1977. Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of *Streptococcus Mutans* 6715 to hydroxyapatite surfaces. *Infect. and Immun.* 18:514-523
- Ericson, T. 1968. Salivary glycoproteins. Composition and adsorption to hydroxyapatite in relation to the formation of dental pellicles and calculus. *Acta Odont. Scand.* 26:3-21
- Ericson, T., K. Pruitt, and H. Wedel. 1975. The reaction of salivary substances with bacteria. *J. oral Pathol.* 4:307-323
- Fujimura, S. and Nakamura T. 1981. Isolation and Characterization of proteases from *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect. Immun.* 33: 738-742.
- Genco, R.J. and Slots, . 1984. Host responses in Periodontal Disease, *J. Dent. Res.* 63:441-445
- Gibbons, R.J. and Mac Donald, J.B. 1961. Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*, *J. Bacteriol.* 81:614-621.
- Gibbons, R.J. and J. van Houte. 1975. Bacteria adherente in oral microbial ecology. *Annu. Rev of Microbiol.* 29:19-44
- Gibbons, R.J and J. van Houte. 1973. On the formation of dental plaques. *J. periodontol.* 44:347-360.
- Gibbons, R.J., E.C. Moreno, and D.M. Spinell. 1973. Model delineating the effects of a salivary

- pellicle on the adsorption of *Streptococcus mitior* onto hydroxyapatite. *Infect and Immun.* 14:1109-1112
- Gibbons R.J 1980. Adhesion of bacteria to surfaces of the mouth. p. 351-388. In R.C.W. Berkeley, J.M., Lynch, J., Melling, P., R Rutter, and B. Vicent (ed), *Microbial adhesion to surfaces.* Ellis Horwood, Publisher. Ltd., London.
 - Gibbons, R.J. and J. van Houte. 1980. Bacterial adherence and the formation of dental plaques, p. 62-104. In E.H. Beachey (ed) *Bacterial adherence, receptors and recognition, Series B, vol. 6* Chapman & Hall., London
 - Gibbons, R.J., and D.M. Spinell. 1970. Salivary induced aggregation of plaque bacteria., p. 129-141. In W.D. McHugh (ed), *Dental plaques.* E & S. Livingstone Ltd., Ed
 - Hausmann E. and Kaufman E. 1970. Collagenase activity in a particulate fraction from *Bacteroides melaninogenicus*
Biochim. Biophys. Biophys Acta 194: 612-615
 - Hay, D.I., R.J. Gibbons and D.M Spinell. 1971. Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque. *Caries Res.* 5: 111-123
 - Hay, D.I. 1967. The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch. Oral Biol.* 12:937-946
 - Holt, S.C., A.C.R. Tanner., and S.S. Socransky. 1980. Morphology and ultrastructure of oral strains of *A.a.* and *Haemophilus aphrophilus.* *Infect. Immun.* 30:588-600
 - Laughon, B. E., Syed, S.A. and Loesche, W. J. 1982. Rapid identification of *Bacteroides gingivalis*, *Clin. Microbiol.* 15:345-346
 - Laughon, B.E., Syed, S.A. and Loesche, W. J. 1982. APIZIM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp. and *Spirochetes* of oral origin, *J. clin. Microb.* 15:97-102
 - Mayhall, C.W. 1977. Aminoacid composition of experimental salivary pellicles. *J. Oral Pathol.* 5:358-370
 - Mayrand, D. and Grenier, D. 1985. Detection of collagenase activity in oral bacteria. *Can. J. Microbiol.* 31:134-138
 - Nakamura, M. and Slots J. 1983. Salivary enzymes-Origin and relationship to periodontal disease. *J. Period. Res.* 18:559-569
 - Newman, M.g. and Socransky S.S. 1977. Predominant culturable microbiota in periodontitis, *J. Period. Res.* 12:120-128
 - Robertson, P.B., M. Lantz, P.T. Marucha, K.S. Otman, C.L. Trummel and S.C. Holt. 1982. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *A.a.*, *J. Perio. Res.* 17:275-283
 - Slots, J. 1981. Enzymatic characterization of some oral and Non-oral Gram negative bacteria with the APIZIM System, *J. clin. Microb.* 14:2888-294
 - Socransky, S.S., A.D. Manganiello, D. Propas, V. Oram and J. van Houte. 1977. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Period. Res.* 12:90-106
 - Suido, H. M, Nakamura, P. A. Mashimo. J.J. Zambon and R.J. Genco. 1986. Arylaminopeptidase activities of oral bacteria. *J. Dent. Res* 65(11): 1335-1340.
 - Zambon. J.J. 1985. *A.a.* in human periodontal disease, *J. clin. Period.* 12: 1-20
 - Zambon, J.J. 1983. *A.a.* in human periodontal disease: prevalence in patients groups and distribution of Biotypes and Serotypes within families. *J. Periodontal.* 54:707-711
 - Zambon, J.J., M. Nakamura and J. Slots. 1985 Effect of Periodontal therapy on salivary enzymatic activity. *J. Period. Res.* 20:652-659.