

36  
-20/10/93

U.N.A.M.

FACULTAD DE ODONTOLOGIA.

TESINA PARA OBTENER EL TITULO DE  
CIRUJANO DENTISTA

PATRICIA BECERRIL CORREA

"SEMINARIO DE TITULACION DE ODONTOPEDIATRIA"

COORDINADORA: C.D. ANGELES. MONDRAGON DEL V.

ASESOR: C.D. VIOLETA ZURITA MURILLO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

NOVIEMBRE 1993.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

" INDICE "

	página
<u>I.- SUMARIO.</u> .....	1
a) Palabras Claves .....	2
<u>II.- INTRODUCCION.</u> .....	3
<u>III.- MATERIALES Y METODOS.</u> .....	6
a) Respuestas del pH in vivo al enjuague con galactosa o con glucosa .....	6
b) Experimentos in vitro con sedimento salival y placa dental .....	6
c) Experimentos de cultivos puros .....	8
<u>IV.- RESULTADOS.</u> .....	10
a) Respuestas del pH ante placas in vivo de galactosa y glucosa .....	10
b) Comparación de las respuestas del pH en la placa y sedimento salival in vitro con galac- tosa y glucosa en la presencia y ausencia de urea o arginina .....	10
c) Comparación de las respuestas del pH de cultivos puros individuales con galactosa y glucosa en pre- sencia y ausencia de urea o arginina .....	11
<u>V.- DISCUSION.</u> .....	13
<u>VI.- ILUSTRACIONES.</u> .....	18
<u>VII.- RECONOCIMIENTOS.</u> .....	22
<u>VIII.- REFERENCIAS.</u> .....	23

" COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LA GALACTOSA Y LA GLUCOSA EN  
LAS RESPUESTAS DEL PH DE LA PLACA DENTAL HUMANA, SEDIMENTO  
SALIVAL Y CULTIVOS PUROS DE BACTERIA ORAL ".

N.O. SALAKO y KLEINBERG\*

Departamento de Biología Oral y Patología, State University of  
Nueva York, Stony Brook,

NY 17794-8702, U.S.A.

( Recibido 3 Diciembre 1991; aceptado 5 mayo 1992 )

SUMARIO:

Comparaciones hechas en la placa dental in vivo demostraron que la galactosa produce una disminución en el pH significativamente más pequeña que la glucosa. Estudios in vitro con la placa, sedimento salival y cultivos puros de bacteria oral realizados en ausencia de factores intraorales tales como la saliva fluida, confirmaron esta menor acidogenicidad de la galactosa. Cultivos puros mostraron que la mayoría de la bacteria probada produce una disminución de moderada a larga con la glucosa, pero solamente es poca con la galactosa; la mayoría produjo una disminución de moderada a pequeña o ninguna respuesta del pH con este azúcar. Esto sugirió que las disminuciones más pequeñas en el pH vistas en la placa in vivo con galactosa, fueron amplias debido a diferencias bacteriales básicamente que, individualmente, los microorganismos residentes tienen menos capacidad galactolítica que glucolítica. Las variaciones en la capacidad se atribuyeron a las diferencias en el proceso de transporte de membranas y sendas metabólicas normalmente disponibles a las bacterias para el catabolismo de glucosa y galactosa. En los experimentos in vitro, debido a que la placa y el sedimento pueden producir base tan fácilmente como pueden producir ácido, los substratos de nitrogenados identificados anteriormente como mayores estimulantes de la formación de base, urea y arginina, fueron

concurrentemente examinadas por sus efectos atenuantes en las respuestas del pH en la galactosa y la glucosa. Estos mostraron, conforme a su menor acidegenicidad, que la galactosa podría ser combatida más fácilmente en su habilidad de reducir el pH, mediante uno u otro de esos dos substratos de formación de base, que lo que podría la glucosa. Los efectos fueron diferentes con urea y con arginina; la atenuación de la urea ocurrió más temprano y la atenuación de arginina más tarde en la placa y el sedimento. Las perfiles de pH de base ácida correspondientes a cultivos puros, fueron diferentes. Ellos mostraron que la mayoría de las bacterias carentes de una o más capacidades galactolíticas, glucolíticas, ureolíticas y arginolíticas es claramente evidente tanto en la placa como en el sedimento. Un descenso significativo con la glucosa fué encontrado en los perfiles del pH de la mayoría de las bacterias examinadas, considerando que tal, no era el caso con la galactosa, con los dos substratos de formación de base examinados al mismo tiempo. Esto sugiere que los cultivos puros mezclados serán necesarios en la construcción de modelos para simular los perfiles del pH de base ácida vistos en la placa y el sedimento con los substratos anteriores. También, el conocimiento de los perfiles del pH de base ácida de bacteria individual debe hacer posible la selección de la bacteria apropiada para tal propósito, así como facilita el entendimiento de cómo la composición microbial de la placa y sus respuestas de pH están relacionadas.

Palabras Claves:

Galactosa, glucosa, pH, placa, sedimento, cultivos orales.

## " INTRODUCCION "

[Debido al papel primario de los azúcares dietéticos en la caries dental, la sucrosa y sus monosacáridos constituyentes, glucosa y fructosa, han sido extensivamente estudiados por sus efectos en la producción de ácido y pH ácido mediante la flora microbiana mezclada en la placa dental y otros sistemas microbianos orales] (Stephan, 1944; Stephan y Hemmens, 1947; Stralfors 1950; Kleinberg, 1961; Neft, 1967; Frostell, 1973; Geddes, 1972 1975; Imfeld, 1983; Harper y Laesche, 1983; Rugg-Gunn, Roberts y Wright, 1985).

Ha sido demostrado que el enjuague con soluciones de tales azúcares resulta en una rápida disminución en el pH de la placa seguida por un lento retorno al nivel inicial (Stephan, 1940; Stralfors, 1950; Imfeld, 1983).

Esta respuesta a un resto del azúcar ha demostrado diferir en individuos y en sitios de diferente actividad de caries, con mayor actividad asociada a una o más respuestas de pH ácido (Stephan, 1944; Kleinberg y Jenkins, 1964; Mandel y Zengo, 1973).

Otros azúcares comunes han sido estudiados por su habilidad para producir un pH ácido en la placa dental incluyendo los disacáridos, maltosa y lactosa (Birkhed, Wickholm y Frostell, 1975).

La maltosa produce un pH y efectos cariogénicos similares a aquellos de la glucosa, fructosa y sucrosa (Stephan y Hemmens 1947; Neff, 1967; Frostell, 1973; Burdevold et al., 1983), donde la lactosa, el disacárido encontrado en la leche humana y de bovino y en muchos alimentos conteniendo productos lácteos, aparece para ser menos acidogénica y menos cariogénica (Shaw, Einsel y Wollman, 1959; Jenkins y Ferguson, 1961; Frostell, 1973; Mor y McDougall, 1977).

Esto ha sido atribuido a la lactosa siendo fácilmente hidrolizada por la bacteria oral, y a la galactosa, uno de sus azúcares

constitutivas, siendo significativamente menos fermentable que la glucosa, su otro componente monosacárido (Kleinberg 1970a).

La galactosa ha sido difícilmente estudiada (Stephan y Hemmens, 1947; Burdevoid et al., 1983), pero podría ser un importante sustrato en el metabolismo de base ácida de la placa, debido a que podría favorecer una menor acidogenicidad que cualquiera de los azúcares comunes anteriores.

La galactosa es el carbohidrato más prevalente en la glicoproteína salival (Caldwell y Pigman, 1966) y sobre la degradación por la bacteria oral (McDougall, 1963; McGaughey y Stowel, 1966; Leach y Critchley, 1966) podría ser disponible a la bacteria de la placa para una continua producción de ácido, especialmente, entre comindas (Stephan, 1944; Kleinberg et al., 1982).

En adición, podría, a través de la selección bacterial (como podrían otros azúcares glicoproteínicos), influir en la composición microbiana de la placa dental (De Jong, van der Hoeven y van Os, 1986; van der Hoeven, 1990).

Nuestro presente estudio tuvo dos objetivos. Uno fue evaluar a la galactosa como un acidógeno en la placa y el sedimento salival, así como parte de un intento que marcha a identificar y caracterizar los sustratos que son centrales a los metabolismos de base ácida de estos sistemas microbianos mezclados y su habilidad para producir cambios substanciales en el pH (Kleinberg, 1970b).

La habilidad de la galactosa para aminorar el pH fue evaluada comparando, primero, su habilidad para disminuir el pH de la placa dental in vivo en relación a la bien estudiada, acidógeno fuerte, glucosa.

Los dos azúcares fueron después comparados en la placa y el sedimento salival in vitro donde los factores orales que pueden afectar el pH, tales como la saliva fluida (Englander, Shkalir y Fosdick, 1959), están ausentes.

Estudios más tempranos han indicado que las comunidades de bacterias mezcladas tanto de la placa como del sedimento, son capaces de producir base tan fácilmente como pueden producir ácido y tal formación de base puede afectar significativamente el pH (Kleinberg, 1961, 1967; Singer et al., 1983).

Los dos substratos nitrogenados identificados como las más capaces para realizarlo fueron la urea y la arginina (Kleinberg y Craw, 1976; Kleinberg, et al., 1979).

Consecuentemente, en los experimentos in vitro de placas y sedimentos, la distribución de los efectos de estos substratos de aumento de pH en la producción de galactosa y glucosa de respuestas del pH ácido, también se examinaron.

Un segundo objetivo fué examinar la bacteria oral que colectivamente comprende el conjunto de microorganismos normalmente encontrados en la placa dental humana y en el sedimento salival, para determinar cuáles tienen actividades galactolíticas, gluco-líticas, ureolíticas y arginolíticas.

Esto se efectuó para determinar la amplitud en la cual se aprecian diferencias en las respuestas de pH en galactosa y glucosa vistas en la placa y sedimento en las primeras series de experimentos, pueden ser debido a diferencias en la capacidad bacteriana de la fermentación de los azúcares.

También, hizo posible la obtención de perfiles de pH de base ácida de la bacteria anterior, para una posible uso ensamblando cultivos puros de bacteria oral, en mezclas con perfiles de pH como los de la placa o sedimentos, o como placas de las diferentes actividades de las caries (Stephan y Hemmens, 1947; Wijeweera y Kleinberg, 1989a).



## " MATERIALES Y METODOS "

### RESPUESTAS DEL PH in vivo AL ENJUAGUE CON GALACTOSA O CON GLUCOSA.

Cinco sujetos que se habían abstenido de cualquier forma de higiene oral por 72 h. y habían ayunado por al menos 12 h. antes de que fueran hechas las mediciones, fueron cada uno examinado mediante el método sucesivo (Stephan y Millar, 1943; Kleinberg 1961; Kleinberg et al., 1982) para la respuesta de pH antes y después de un enjuague de 1 min. con 560 mM de solución de galactosa.

Los sitios medidos de la placa fueron las cinco regiones labiales proximales entre los seis dientes maxilares anteriores usando electrodos pH de antimonio tipo-toque (Kleinberg, 1958; Kleinberg et al., 1982)/

Después de tomar lecturas a intervalos regulares sobre un período de 1 h., los mismos sujetos enjuagaron después sus bocas con 560 mM de solución de glucosa.

El pH fué nuevamente leído a intervalos similares y en los mismos cinco sitios por un segundo período de 1h.

Experimentos similares fueron hechos con (i) enjuagues sucesivos con 560mM de glucosa y (ii) enjuagues sucesivos con 560mM de galactosa.

### EXPERIMENTOS in vitro CON SEDIMENTO SALIVAL Y PLACA DENTAL.

Para cada experimento, fué colectada placa de tres sujetos que habían evadido toda medida de higiene oral por 72h. y no habían comido por 12h. antes del tiempo de colección de la placa,

la cual fué hecha en la mañana entre las 8:00 y 10:00 am. (Singer et al., 1983).

La placa de cada donador fué colectada con una espátula de acero inoxidable y esparcida en 0.1ml de agua estéril destilada contenida en un tubo de ensaye de polipropileno de 0.4ml enfriado en hielo picado.

Las suspensiones de la placa fueron puestas en un recipiente y centrifugadas a 1740g por 15 min a 4°C.

Después de descartar el excedente, la tableta fué lavada tres veces mediante una resuspensión sucesiva en agua fría destilada y centrifugación.

Una suspensión final fué después hecha en agua destilada para llevar a cabo una concentración del 25% de suspensión de provisión (v/v) (Singer et al., 1983).

Para los experimentos del sedimento salival, toda la saliva estimulada con cera fué colectada de los mismos sujetos en tubos de ensaye enfriados en hielo picado.

Las pruebas de saliva fueron puestas en un recipiente y centrifugadas a 1740g por 15min a 4°C.

El excedente fué descartado y el sedimento fué lavado tres veces y suspendido en agua destilada ante una concentración de la suspensión del 50% (v/v).

Las mezclas de incubación de ambas suspensiones de la placa y el sedimento salival, fueron después preparadas en microelectrodos de vidrio acopados de pH (Radiómetro G2221C, Copenhagen, Dinamarca) e incubados en los aparatos descritos por Singer et al., (1983).

Las mezclas tuvieron las composiciones finales y concentraciones siguientes: (a) 8.3% (v/v) placa o 16.7% (v/v) sedimento salival; (b) 2.8 mM glucosa, 2.8 mM galactosa o ninguno de estos

substratos; y (c) arginina como la sal de bicarbonato (a menos que se indique lo contrario) o como la base libre a 3.3 mM urea a 3.0 mM o ninguno de estos substratos.

El pH inicial de cada mezcla de incubación se ajustó a 7.0 con 0.1M de NaOH ó 0.1M de HCl.

Las mezclas fueron después incubadas por 4h. a 37°C y el pH fué monitoreado a lo largo de varios intervalos.

### EXPERIMENTOS DE CULTIVOS PUROS.

Los microorganismos enlistados en la tabla 1 fueron, cada uno, desarrollados en el medio mostrado en la tabla.

Después de 18-24 h., cada uno fué cosechado por centrifugación a 10,000g y por 30 min. a 4°C.

La tableta bacterial en cada cso fué lavada tres veces con agua destilada esterilizada y después de cada lavado fué centrifugada a 1740g por 15 min. a 4°C. La tableta fué después incubada en agua destilada esterilizada ante un pH 7.0 en un stat de pH [Radiómetro (Denepitiya y Kleinberg, 1984)] por 1h. a 37°C para disipar los substratos endógenos, especialmente el carbohidrato (Critchley, 1969; Gibbons y Socransky, 1962; von Houte, 1964; Berman y Gibbons, 1966; Tanzer et al., 1976), el cual, podría afectar significativamente el pH (Denepitiya y Kleinberg, 1984; Wijeyeweera y Kleinberg, 1989b).

De otro modo, la placa o sedimento salival colectados bajo condiciones de abstinencia, los cultivos puros son cosechados de un medio de crecimiento rico y tal como la preincubación ha sido encontrada necesaria en el pasado (Denepitiya y Kleinberg, 1984; Wijeyeweera y Kleinberg, 1989b) para hacer las comparaciones posibles.

La bacteria fué después centrifugada a 1740g por 15min a 4°C lavada con agua destilada esterilizada y después suspendida en varias mezclas de incubación a una concentración final de 8.3% (v/v).

Así como en los experimentos de la placa y el sedimento, la glucosa o galactosa estaba a 2.8mM; en las mezclas conteniendo arginina o urea, las concentraciones de estos substratos nitrogenados fueron 3.3 y 3.0mM, respectivamente.

Nuevamente, como en los experimentos de bacteria mezclada, el pH inicial fué ajustado a 7.0 con 0.1M HCl o 0.1M NaOH y los cambios de pH fueron monitoreados a intervalos regulares y a la largo de una incubación de 4 h.

Los valores de pH observados fueron graficados contra tiempo y el área entre la curva y el pH inicial de 7.0 en cada caso fué calculada y expresada en unidades pH-h (Denepitiya y Kleinberg, 1984).

## " RESULTADOS "

### RESPUESTAS DEL PH ANTE PLACAS in vivo DE GALACTOSA Y GLUCOSA.

La galactosa y la glucosa, tienen ambas una rápida caída inicial de pH seguida por una más lenta elevación a aproximadamente, su pH inicial.

La glucosa produce una respuesta más acídica de pH que la galactosa.

Como en tales pruebas más tempranas (Stephan y Millar, 1943; Kleinberg, 1961), las pruebas sucesivas con el mismo azúcar, dieron resultados casi idénticos (Fig.1).

### COMPARACION DE LAS RESPUESTAS DEL PH DE LA PLACA Y SEDIEMTO SALIVAL in vitro CON GALACTOSA Y GLU- COSA EN LA PRESENCIA Y AUSENCIA DE UREA O ARGININA.

Resultados comparables fueron obtenidos con sedimento salival y placa dental en todos los substratos probados (Figs. 2 y 3).

Una respuesta de pH ácido (caída de pH seguida de elevación de pH) fué obtenida con glucosa y galactosa, pero la glucosa produjo una respuesta más acídica que la de la galactosa [(Fig. 2 (a))].

Cuando la glucosa y la urea estuvieron ambas presentes en la mezcla de incubación, hubo una rápida caída inicial de pH seguida por una más lenta elevación de pH [Fig. 3 (a)].

De otra manera, cuando la galactosa reemplazó a la glucosa, el reverso fué observado, había una rápida elevación del pH seguida por una caída más lenta [Fig. 3 (a)].

Cuando cada azúcar fué combinado con arginina [Fig. 3 (b)], el pH en ambos casos cayó al mínimo y después regresó lentamente a los niveles iniciales.

La caída fué mayor con glucosa y arginina que con galactosa y arginina, por lo tanto, las curvas de pH para el primero, alcanzaron un nivel más ácido que el correspondiente a las curvas de este último.

En las mezclas controladas, es decir, las mezclas donde los substratos fueron urea o arginina y la galactosa y la glucosa fueron omitidas [Figs. 2(b) y (c)], una elevación de pH rápida y substancial fué observada con urea.

De otra manera, una elevación más lenta y progresiva se observó con arginina [Fig. 2(b)], pero con la arginina, como la base libre y por tanto una capacidad de bufer menor que si estuviera presente como la sal bicarbonatada usada en nuestros experimentos, un pequeño declive inicial en el pH se observó antes de mostrar la elevación gradual subsecuente [Fig. 2(c)].

#### COMPARACION DE LAS RESPUESTAS DEL PH DE CULTIVOS PUROS INDIVIDUALES CON GALACTOSA Y GLUCOSA EN LA PRESENCIA Y AUSENCIA DE UREA O ARGININA.

Con excepción de la Veillonella aislada, la cual nos dió una respuesta de pH con glucosa o galactosa, todos excepto unas cuantas bacterias que fueron probadas produjeron una mayor disminución de pH con glucosa (Tabla 2), y todas excepto unas cuantas diferentes que dieron una moderada a pequeña o ninguna reducción de pH con galactosa (comparar columnas 1 y 2 de Tabla 2 y ver Figs. 4-8).

Para expresar la magnitud y el nivel de significación estadística de las casi universalmente más pequeñas respuestas de pH con galactosa que con glucosa, las respuestas con los diferentes cultivos puros probados han sido promediados en la Tabla 2 (cf. columnas 2,4 y 6 a columnas 1,3 y 5, respectivamente) y la significación estadística de estos promedios se muestran en la Tabla 3.

Este promedio fué hecho para permitir alguna comparación cuantitativa y debiera ser equilatada por la variación en los números bacteriales, se hicieron algunos intentos para aplicar estos resultados a aquellos que tienen lugar en la placa in vivo.

La caída en el pH con glucosa fué, generalmente inmediata y rápida, y mientras que aquella con galactosa fué generalmente más lenta o significativamente retrasada.

En las incubaciones donde los azúcares se combinaron con arginina o urea, las diferencias galactosa-glucosa fueron todavía vistas (ver Tabla 2 y los ejemplos en las Figs. 4 y 8).

Esto fué tan parejo que la bacteria varió ampliamente en su habilidad para responder al cuarto substrato de prueba, glucosa, galactosa, urea y arginina. Por ejemplo, el *Estafilococcus epidermis*, aislado rápidamente en todos los casos, fueron usados todos los cuatro substratos para la formación de la base ácida (Fig. 4).

El *Actinomyces viscosus*, usó rápidamente galactosa, glucosa y urea pero no arginina (Fig. 5).

El *Streptococcus sanguis* tipo II, usó únicamente galactosa y glucosa (Fig. 6).

El *Streptococcus miller* y *Streptococcus mitior*, usaron rápidamente glucosa, y difícilmente usaron galactosa o urea, pero en el caso del *Streptococcus milleri*, éste usó arginina y en el caso del *Streptococcus mitior*, éste no lo usó. (Figs. 7 y 8).

## " DISCUSION "

La comparación de la habilidad de la glucosa y la galactosa para disminuir el pH en la placa dental in vivo, después de un enjuague de 1m. que claramente mostró a la galactosa para ser mucho menos acidogénica (Fig. 1).

Cuando los dos azúcares fueron comparados en mezclas de incubación conteniendo cada recipiente placa dental o sedimento salival bajo condiciones que producen cambios en el pH de base ácida como aquellos vistos en la placa in situ (Singer et al., 1983), la galactosa mostró todavía, un declive más lento y más pequeño en el pH que los hecho por la glucosa (Fig. 2).

Tanto los factores intraorales que pueden afectar la respuesta del pH, como la continuamente saliva fluía (Englander et al., 1959), están ausentes en estos experimentos in vitro, las diferencias vistas con los dos azúcares in vivo debieron ser debidas a diferencias en la capacidad de fermentación bacterial.

Los experimentos de cultivo puro apoyaron esta conclusión.

Excepto para la Veillonella aislada, casi todas las bacterias probadas fueron aptas para producir decreciones substanciales en el pH con glucosa donde sólo unas pocas podrían hacerlo mismo con la galactosa.

La mayoría de las bacterias mostraron una respuesta moderada a pequeña o ninguna respuesta de pH con este azúcar (Tabla 2).

La diferencia en la habilidad de la bacteria individual para fermentar glucosa y galactosa podría ser el resultado de las diferencias en el transporte de la membrana y/o las sendas metabólicas (Lawrence, Thomas y Tenzaghi, 1976; Thomas, 1976; Thomas, Turner y Crow 1980; Denco, Blantan y Benoit 1972; Le Blanc et al., 1979).



A diferencia de la glucosa, la represión de las permeasas necesitadas por la bacteria para transportar y metabolizar galactosa ocurre fácilmente (Thompson, 1979; Hickey, Hillier y Jago, 1986).

Las sendas metabólicas para la galactosa son aptas para ser aquellas resultantes en un tipo heteroláctico de fermentación, en vez del tipo homoláctico más comúnmente visto con la glucosa (Thomas et al., 1980; Arias y Cervenamsky, 1986).

Esto pudiera resultar en una respuesta de pH menos ácida. En consecuencia, la inhabilidad para transportar o para utilizar la galactosa, se podría considerar en el efecto visto en algunos cultivos puros donde no había, o había una muy pequeña caída del pH con este azúcar (Figs. 7 y 8).

El catabolismo heteroláctico de la galactosa con la formación de niveles más altos de ácidos débiles (tales como el acético) y no ácidos (como el etanol), se podría considerar en las caídas moderadas de pH vistas para otra bacteria con galactosa (Figs. 4-6).

Una fermentación homoláctica con galactosa se podría considerar, en la poca bacteria restante, para sus largas disminuciones de pH y su semejanza con aquellas para la glucosa (Tabla 2).

En los experimentos in vitro de la placa y sedimento salival, donde los efectos de formación de base en la formación de ácido a partir de la galactosa y la glucosa, se examinaron, la reducción en el pH con galactosa se vió mucho más afectada que la observada con glucosa; esta observación es consistente con la galactosa, no obstante ser más débil acidógeno que la glucosa.

Con la urea que estimula la formación de base, el pH aumenta con galactosa y disminuye con glucosa [Fig. 3(a)].

Con arginina como estimulante, la respuesta del pH fué diferente que la realizada con urea; básicamente, la urea trabajó

más pronto y más rápido, mientras que la arginina mostró un aumento de pH más lento y más progresivo.

Esta característica de la arginina es independiente de que se encuentre presente en su forma de base libre o de bicarbonato [Figs. 2(b) y (c)].

La forma de bicarbonato puede hacer que la arginina actúe como un inhibidor más efectivo en la disminución del pH, mediante el empleo de bicarbonato como agente buffer, el principal buffer en la saliva in vivo (Lilienthal, 1955).

En la presencia de más glucosa acidogénica, la respuesta total de pH se redujo menos con arginina, que cuando el azúcar fué la galactosa (Fig. 3).

Colectivamente, los cambios de pH en estos experimentos, reflejaron la relativa capacidad de formación de base ácida de los sedimentos de microfloras de placa y salivas con los varios substratos.

Esto se ilustra en los experimentos de arginina, donde la galactosa de formación ácida más débil y la glucosa de formación ácida más fuerte, produjeron curvas de pH de configuración similar con la placa y el sedimento, pero a diferentes niveles en la escala de pH.

También se observaron diferencias en los niveles a pesar de las similitudes en la configuración de las respuestas del pH de la placa (como las que aparecen en la Fig. 3), en comparación de placas de caries activas y caries inactivas in vivo e in vitro (Steohan, 1944; Kleinberg et al., 1982).

En cada caso, las diferencias en pH se pueden atribuir a diferencias en las magnitudes relativas de procesos de formación de ácido y de base (Kanapka y Kleinberg, 1983).

Sin embargo, las bases de las diferencias de las placas de caries activas y caries inactivas, probablemente se puede atribuir a agentes microbiales, mientras que las bases de la Fig. 3,

pueden ser atribuidas principalmente a la diferencia de la degradabilidad del sustrato.

Es evidente que de nuestras investigaciones con cultivos puros los perfiles de pH de base ácida de la mayoría, fueron substancialmente diferentes de los perfiles de pH de la placa y del sedimento.

Esto se debe a que la mayor parte de la bacteria oral carecía de una o de más de las actividades galactolíticas, glucolíticas, ureolíticas o arginolíticas, claramente evidentes en la placa y sedimento de sistemas bacterianos mixtos.

La mayor parte de las bacterias examinadas, mostraron una significativa reducción del pH con glucosa en sus perfiles de pH de base ácida.

Este, no fué el caso de la galactosa, urea y arginina.

La inhabilidad de producir un cambio de pH con estos tres sustratos fué común en muchas de las bacterias.

Esto significa que la mezcla de cultivos puros, tal como fué hecho por Stephan y Hemmens (1947) y Wijeyeweera y Kleinberg (1989a), podría ser necesario si los modelos de cultivos puros se tuvieran que construir con perfiles de pH como los de la placa y el sedimento. Por sí mismos, los cultivos puros no se pueden considerar como representativos.

La construcción de modelos microbiales mixtos a partir de una apropiada mezcla de cultivos puros de bacteria oral, tiene la ventaja de producir un sistema microbial mixto definido.

Esto podría facilitar el estudio de cómo la composición microbial de las placas y su pH responden como relacionados entre sí, y ambos se pueden manipular para controlar la patogenicidad de la placa (Kleinberg, 1990).

Como se puede ver en ésta y otras dos investigaciones anteriores de nuestro laboratorio (Denepitiya y Kleinberg, 1982; Singer et al., 1983), las respuestas del pH de grupos dentales de

de sediemntos salivales y de la palca, adecuadamente ajustados para la concentración de células, son básicamente similares] (Kleinberg, 1970c; Singer et al.,1983).

Tal similitud ha demostrado ser afortunada, porque el sedimento salival es mucho más completo que la de la placa dental; ésto ha permitido estudiar extensivamente los aspectos metabólicos de los cambios de pH de las placas (Kleinberg, 1970 c; Kleinberg et al., 1982), así como la identificación de substratos usados para producir los perfiles de pH de base ácida aquí vistos.

" ILUSTRACIONES "

Micro-organisms	Source	Growth medium
<i>Streptococcus sanguis</i> I	ATCC 10556	BHI broth
<i>Streptococcus</i> II	ATCC 10557	BHI broth
<i>Streptococcus mitis</i>	NCTC 10712	BHI broth
<i>Streptococcus milleri</i>	NCTC 10708	BHI broth
<i>Streptococcus mutans</i> BHIT	Dr V. Iacono, SUNY, Stony Brook, NY, U.S.A.	BHI broth
<i>Streptococcus mutans</i> 10449	Dr R. J. Gibbons, Forsyth Dental Center, Boston, MA, U.S.A.	BHI broth
<i>Streptococcus mutans</i> LM7	Dr R. J. Gibbons	BHI broth
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 4082	BHI broth
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975	BHI broth
<i>Actinomyces viscosus</i>	ATCC 15957	Actinomyces broth
<i>A. sobrinus</i>	ATCC 1798	Actinomyces broth
<i>A. naehdandi</i>	ATCC 19039	Actinomyces broth
<i>Nisseria sicca</i>	ATCC 29255	Tryptic soy broth
<i>N. subflava</i>	ATCC 10555	Tryptic soy broth
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coagulase-negative isolate from plaque in our laboratory	BHI broth
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Dr T. F. McNamara, SUNY, Stony Brook, NY, U.S.A.	PYE broth
<i>L. tobacillus cavi</i>	NCTC 6375	Rogosa broth
<i>L. fermentum</i>	NCTC 6991	Rogosa broth
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	Rogosa broth
<i>L. salivarius</i>	ATCC 11741	Rogosa broth
<i>L. cellulosus</i>	ATCC 11739	Rogosa broth
<i>L. brevis</i>	ATCC 11577	Rogosa broth
<i>Veillonella</i> spp.	Isolated from plaque in our laboratory	<i>Veillonella</i> broth
<i>Fraxella intermedius</i>	ATCC 25611	PYE broth
<i>Propionibacterium gingivale</i>	ATCC 33277	PYE broth
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (Biotype II)	Isolated from plaque in our laboratory	BHI broth supplemented with I and A factors
<i>H. segnis</i>	ATCC 33393	BHI broth supplemented with F and A factor

Tabla 1. Bacteria oral probada, su procedencia, y el medio en el cual fueron crecidas.

All broths listed were obtained from Difco (Detroit, MI, U.S.A.)

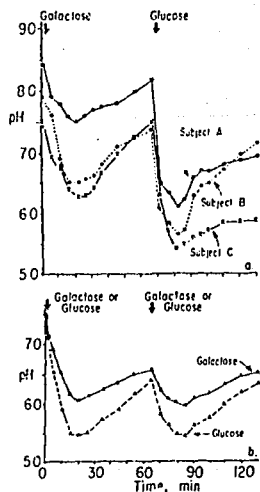
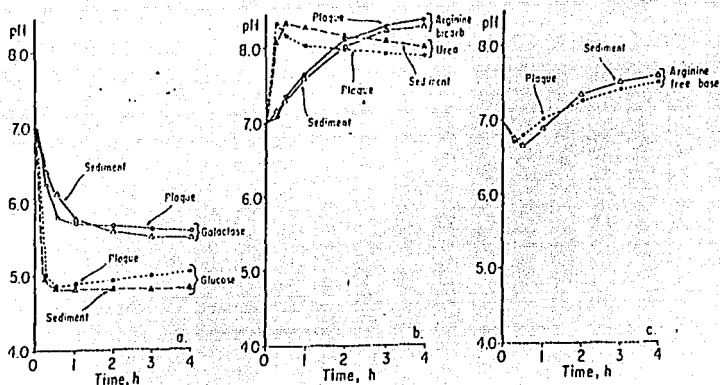
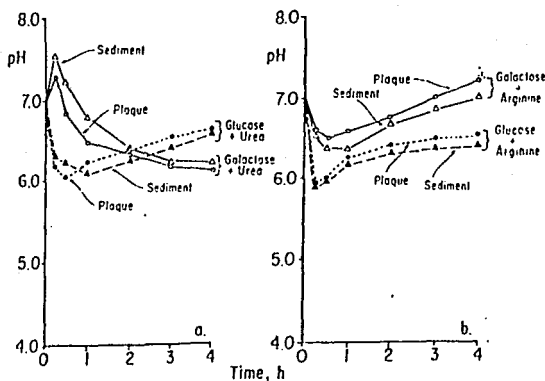


Fig. 1 Respuesta del pH in vivo de la placa dental después de un enjuague de 1 min. con 560 mM de galactosa o glucosa. En (a) la galactosa y la glucosa son comparadas secuencialmente en cada uno de tres sujetos con diferentes respuestas de pH. En (b) la comparación fué hecha entre la glucosa (i) y la glucosa y entre la galactosa (ii) y la galactosa para una prueba para cualquier efecto de exposición al primer azúcar podría tener un subse-



**Fig. 2** Respuesta del pH in vitro de la placa dental y sedimento salival para una estimulación con (a) 2.8mM de galactosa o glucosa, (b) 3.3mM de arginina bicarbonato o 3.0mM de urea y (c) de arginina base libre.



**Fig. 3** Respuesta del pH in vitro de la placa dental y sedimento salival para una estimulación con galactosa o glucosa en combinación con (a) urea o (b) arginina. Las concentraciones del sustrato aquí y en las figuras siguientes son las mismas que en la captura de la Fig. 2.

Table 2. Acid production in a 4-h incubation of the different pure cultures tested

Micro-organisms tested	Glucose	Galactose	Glucose + arginine	Galactose + arginine	Glucose + urea	Galactose + urea	Arginine	Urea
<i>Streptococcus sanguis</i> I	10.03	2.58	4.02	-3.09	10.01	2.57	-4.11	0.37
<i>Strept. sanguis</i> II	10.31	6.61	10.01	6.58	10.31	6.62	-0.29	0.18
<i>Strept. mitior</i>	11.52	1.20	10.07	1.04	11.51	0.98	-0.04	-0.42
<i>Strept. milleri</i>	8.50	2.41	4.15	-5.90	8.51	2.39	-6.87	-0.07
<i>Strept. mutans</i> BHT	7.11	1.37	1.79	-3.29	6.98	1.35	-5.05	0.52
<i>Strept. mutans</i> 10449	12.59	6.57	12.18	6.32	12.37	6.62	-0.50	0.46
<i>Strept. mutans</i> LM7	9.62	2.45	8.89	1.98	9.64	2.44	0.13	0.80
<i>Strept. faecalis</i>	11.64	1.75	1.41	-4.16	11.56	1.69	-5.35	0.08
<i>Strept. salivarius</i>	5.09	2.24	4.81	1.92	4.71	2.01	0.59	0.27
<i>Actinomyces viscosus</i>	7.25	5.19	6.85	4.89	6.46	5.21	-0.13	-1.37
<i>A. odontolyticus</i>	7.10	3.46	6.81	3.27	7.10	3.46	0.15	0.04
<i>A. naeslundii</i>	6.57	4.29	6.24	3.88	5.45	4.01	-0.15	0.15
<i>Neisseria sicca</i>	4.03	0.88	3.49	-0.08	3.98	0.88	-0.06	0.33
<i>N. subflava</i>	8.12	0.45	7.98	0.41	8.07	0.44	0.16	0.04
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8.16	2.69	3.79	-2.70	5.38	-0.76	-4.01	-2.36
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10.14	0.58	9.76	0.52	10.14	0.58	-0.05	0.01
<i>Lactobacillus casei</i>	9.85	7.25	9.55	6.91	8.76	7.10	0.10	0.27
<i>L. fermentum</i>	6.47	6.36	0.20	-0.22	6.47	6.21	-4.64	-0.09
<i>L. acidophilus</i>	9.67	0.48	9.46	0.39	9.66	0.51	0.21	0.01
<i>L. salivarius</i>	10.21	8.21	9.89	7.57	9.98	8.21	0.10	0.03
<i>L. cellobiosus</i>	8.01	5.76	-0.05	-1.29	7.74	4.96	-4.14	0.66
<i>L. brevis</i>	8.20	8.35	0.52	0.57	8.19	8.40	-4.12	-0.04
<i>Veillonella</i> spp.	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	-0.01	-0.01
<i>Prevotella intermedia</i>	4.19	3.20	3.13	3.04	4.19	3.54	-0.41	0.96
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3.69	2.87	3.74	2.86	4.13	2.46	1.00	1.46
<i>Hemophilus parainfluenzae</i> (Biotype II)	7.24	2.05	5.98	1.85	6.82	2.65	-0.31	-1.21
<i>H. segnis</i>	2.78	1.42	2.65	1.02	2.79	1.52	0.04	0.02
Mean $\pm$ SD	7.72 $\pm$ 2.97	3.36 $\pm$ 2.53	5.20 $\pm$ 3.65	2.81 $\pm$ 2.31	7.43 $\pm$ 2.98	3.61 $\pm$ 3.00	-1.45 $\pm$ 2.14	0.16 $\pm$ 0.58

Expressed in pH h units (Denepitija and Kleinberg, 1984).

Tabla 2. Producción de ácido en una incubación de 4h de los diferentes cultivos puros probados

Tabla 3. Análisis estadístico (Student's t-test) de comparaciones de la habilidad de los cultivos puros de bacteria oral para producir las respuestas\* de base ácida mostradas en Tabla 2 (n=27).

	t	p
Glucose versus galactose	5.8	<0.001
Glucose + arginine versus galactose + arginine	3.4	<0.001
Glucose + urea versus galactose + urea	4.8	<0.001
Glucose versus glucose + arginine	2.9	<0.005
Galactose versus galactose + arginine	8.3	<0.001
Glucose versus glucose + urea	0.4	>0.5
Galactose versus galactose + urea	3.3	<0.005
Arginine versus urea	3.1	<0.005

\*Debido a que la bacteria en cada sustrato se compara tratada igualmente y no se valora de acuerdo a sus números en la placa dental, a mayor número de bacteria en cada comparación que muestra una diferencia del sustrato a mayor es la diferencia entre los sustratos promediados y la probabilidad de estos promedios a ser estadísticamente diferentes.

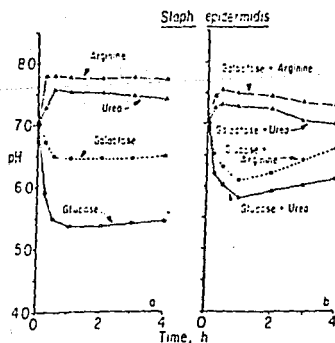


Fig. 4 Respuesta del pH in vitro del *Staphylococcus epidermidis* aislado para una simulación con glucosa o galactosa en (a) ausencia y (b) presencia de urea o arginina. Nótese que este organismo usa todas las cuatro pruebas de sustratos.

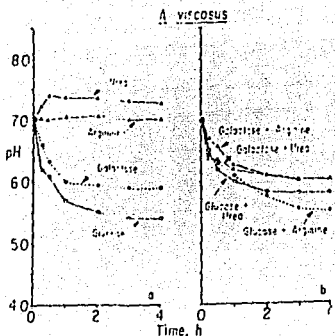


Fig. 5 Respuesta del pH in vitro de *Actinomyces viscosus* para estimulación con glucosa o galactosa en (a) ausencia y (b) presencia de urea o arginina. Nótese que este organismo usa glucosa, galactosa y urea pero no arginina.

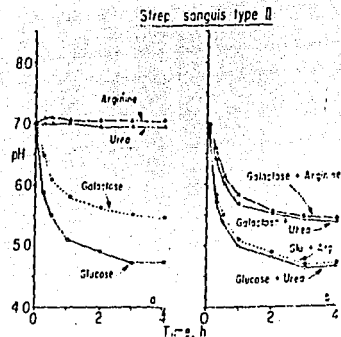


Fig. 6 Respuesta del pH in vitro de *Streptococcus sanguis* tipo II (ATCC 10557) para estimulación con glucosa o galactosa en (a) ausencia y (b) presencia de urea o arginina. Nótese que este organismo usa glucosa y galactosa pero no urea o arginina.

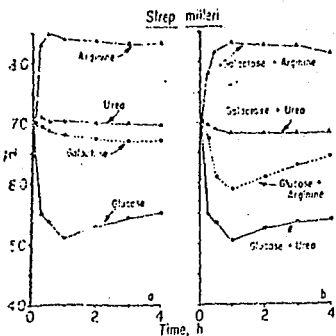


Fig. 7 Respuesta del pH in vitro de *Streptococcus milleri* (ATCC 10708) para estimulación con glucosa o galactosa en (a) ausencia y (b) presencia de urea o arginina. Nótese que este organismo usa glucosa pero no, o muy poca, urea o galactosa.

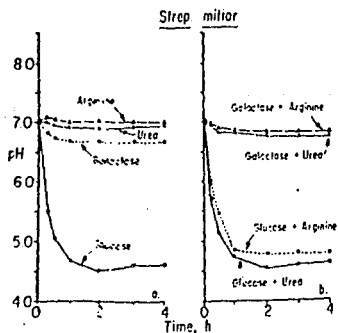


Fig. 8 Respuesta del pH in vitro de *Streptococcus mitior* (ATCC 905) para estimulación con glucosa o galactosa en (a) ausencia y (b) presencia de urea o arginina. Nótese que este organismo usa glucosa pero no, o muy poca, urea, arginina o galactosa.



" REFERENCIAS "

- Arias A. and Cervenansky C. (1986) Galactose metabolism on *Rhizobium meliloti* L3-50. *J. Bacteriol.* 167, 1092-1094
- Berman K. S. and Gibbons R. J. (1966) Isophilic polysaccharide synthesis by human and rodent plaque. *Archs oral Biol.* 11, 533-542
- Birkhed D., Wickholm H. and Frostell G. (1975) Degradation of maltose and starch by human saliva and by supernatant of dental plaque material. *Odont Rev* 26, 7-16
- Brudevold F., Tehrani A., Aftabzadeh F., van Houte J. and Russo J. (1983) Enamel demineralization potential of dietary carbohydrate. *J. dent. Res.* 62, 1218-1220
- Caldwell R. C. and Pughan W. (1966) Changes in protein and glycoprotein concentrations in human submaxillary saliva under various stimulatory conditions. *Archs oral Biol.* 11, 437-449
- Critchley P. (1969) The breakdown of the carbohydrate and protein matrix of dental plaque. *Caries Res.* 3, 249-265
- De Jong M. H., van der Hoeven J. S. and van Os J. H. (1986) Growth of micro-organisms from supragingival dental plaque on saliva agar. *J. dent. Res.* 65, 85-88
- Denco G. M., Blanton S. J. B. and Benoit R. E. (1972) Heterofermentative carbohydrate metabolism of lactose-impaired mutants of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 112, 1335-1345
- Denepitya L. and Kleinberg I. (1982) A comparison of the microbial composition of pooled human dental plaque and salivary sediment. *Archs oral Biol.* 27, 739-745
- Denepitya L. and Kleinberg I. (1984) A comparison of the acid-base and aciduric properties of various serotypes of the bacterium *Streptococcus mutans* associated with dental plaque. *Archs oral Biol.* 29, 384-393
- Englander H. R., Shklar I. L. and Fosdick L. S. (1959) The effects of saliva on the pH and lactate concentration in dental plaques. I. Caries-rampant individuals. *J. dent. Res.* 38, 848-855
- Frostell G. (1973) Effects of mouth rinses with sucrose, glucose, fructose, lactose, sorbitol and Lycasin on the pH of dental plaque. *Odont Rev* 24, 217-226
- Geddes D. A. M. (1972) The production of D(-) and DL-lactic acid and volatile acids by human dental plaque and the effect of plaque bacteria and acid strength on pH. *Archs oral Biol.* 17, 537-545
- Geddes D. A. M. (1975) Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. *Caries Res.* 9, 98-100
- Gibbons R. J. and Socransky S. S. (1962) Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaque: its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. *Archs oral Biol.* 7, 73-80
- Harper D. S. and Loesche W. J. (1983) Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various serogroups of *Streptococcus mutans*. *J. dent. Res.* 62, 526-531
- Hickey M. W., Hillier A. J. and Jago G. L. (1986) Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 825-831
- van der Hoeven J. S. (1960) The effects of saliva on plaque microbiology. In *Saliva and Dental Health* (Eds Edgar W. M. and O'Mullane D. M.), pp. 49-54. British Dental Ass., London.
- van Houte J. (1964) Relation between carbohydrate intake and polysaccharide storing microorganisms in dental plaque. *Archs oral Biol.* 9, 91-93
- Imfeld T. N. (1983) *Identification of Low Caries Risk Dietary Components*. Karger, Basel
- Jenkins G. N. and Ferguson D. B. (1961) Milk and dental caries. *Brit. dent. J.* 120, 472-477
- Kanapka J. A. and Kleinberg I. (1983) Catabolism of arginine by the mixed bacteria in human salivary sediment under conditions of low and high glucose concentration. *Archs oral Biol.* 28, 1007-1015
- Kleinberg I. (1958) The construction and evaluation of modified types of antimony micro-electrodes for intra-oral use. *Br. dent. J.* 104, 197-204
- Kleinberg I. (1961) Studies on dental plaque. I. The effect of different concentrations of glucose on the pH of dental plaque *in vivo*. *J. dent. Res.* 40, 1087-1111
- Kleinberg I. (1967) Effect of urea concentration on human plaque pH levels *in situ*. *Archs oral Biol.* 12, 1475-1484
- Kleinberg I. (1970a) Formation and accumulation of acid on the tooth surface. *J. dent. Res.* 49, 1361-1316
- Kleinberg I. (1970b) Regulation of the acid-base metabolism of the dentogingival plaque and its relation to dental caries and periodontal disease. *Int. dent. J.* 20, 451-465
- Kleinberg I. (1970c) Biochemistry of the dental plaque. *Adv. oral Biol.* 4, 43-990
- Kleinberg I. (1980) New approaches for controlling dental plaque pathogenicity. *V. Y. State dent. J.* 56, 31-34
- Kleinberg I. and Jenkins G. N. (1964) The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva. *Archs oral Biol.* 9, 493-516
- Kleinberg I., Kanapka J. A. and Crow D. (1976) Effect of saliva and salivary factors on the metabolism of the mixed flora. In *Microbial Aspects of Dental Caries* (Ed. Siles H. M., Loesche W. J. and O'Brien T. C.), pp. 453-464. Information Retrieval, New York and Washington.
- Kleinberg I., Kanapka J. A., Chatterjee R., Crow D., D'Angelo N. and Sandham H. J. (1979) Metabolism of nitrogen by the oral mixed bacteria. In *Saliva and Dental Caries* (Ed. Kleinberg I., Ellison S. A. and Mandel I. D.), pp. 357-377. Information Retrieval, New York and Washington.
- Kleinberg I., Jenkins G. N., Chatterjee R. and Wijeyewera L. (1982) The antimony pH electrode and its role in the assessment and interpretation of dental plaque pH. *J. dent. Res.* 61, 1139-1147
- Lawrence R. C., Thomas T. D. and Tenzaghi B. E. (1976) Reviews of the progress of dairy science. Cheese starters. *J. dairy Res.* 43, 141-193
- Leach S. A. and Critchley P. (1966) Bacterial degradation of glycoprotein sugars in human saliva. *Nature* 209, 506
- LeBlanc D. J., Crow V. L., Lee L. N. and Garore C. V. (1979) Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 137, 878-884

- Lilienthal B. (1955) An analysis of the buffer systems in saliva. *J. dent. Res.* 34, 516-530.
- Mandel I. D. and Zengo A. N. (1973) Genetic and chemical aspect in resistance. In *Comparative Immunology of the Oral Cavity* (Ed. Mergenbagen S. E. and Scherp H. W.). HEW Publication No. (NIH) 73-438. Public Health Services, Bethesda, MD.
- McDougal W. A. (1963) Studies on the dental plaque III: the effect of saliva on salivary mucoids and its relationship to the regrowth of plaque. *Aust. dent. J.* 8, 463-467.
- McGaughey C. and Stowell E. C. (1966) Plaque formation by purified salivary mucin *in vitro*. Effects of incubation, calcium and phosphate. *Nature* 209, 897-899.
- Mor B. M. and McDougal W. A. (1977) Effect of milk on pH of plaque and salivary sediment and the oral clearance of milk. *Caries Res.* 11, 223-230.
- Ned D. (1967) Acid production from different carbohydrate sources in human plaque *in situ*. *Caries Res.* 1, 78-87.
- Ruge-Gunn A. J., Roberts G. J. and Wright W. G. (1985) Effect of human milk on plaque pH *in situ* and enamel dissolution *in vitro* compared with bovine milk, lactose and fructose. *Caries Res.* 19, 327-334.
- Shaw J. H., Ensfield B. J. and Wolfman D. H. (1959) Studies on the relation of dairy products to dental caries in caries susceptible rats. *J. Nutr.* 67, 253-273.
- Singer D. L., Chatterjee R., Denepitaya L. and Kleinberg I. (1983) A comparison of the acid-base metabolism of pooled human dental plaque and salivary sediment. *Archs oral Biol.* 28, 29-35.
- Stephan R. M. (1940) Changes in hydrogen ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. *J. Am. dent. Ass.* 27, 718-723.
- Stephan R. M. (1944) Intraoral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. *J. dent. Res.* 23, 257-266.
- Stephan R. M. and Millar B. F. (1943) A quantitative method for evaluating physical and chemical agents which modify production of acids in bacterial plaques on human teeth. *J. dent. Res.* 22, 45-51.
- Stephan R. M. and Hemmens E. S. (1947) Studies of changes in pH produced by pure cultures of oral microorganisms. *J. dent. Res.* 26, 15-40.
- Stralfors A. (1950) Investigation into the bacterial chemistry of dental plaques. *Odont. Tidskr.* 58, 153-341.
- Tanzer J. M., Friedman M. L., Woodleg F. N., Esfert R. L. and Rineheimer L. A. (1976) Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In *Microbial Aspects of Dental Caries* (Ed. Stiles H. M., Loesche W. J. and O'Brien T. C.), pp. 597-616. Information Retrieval, New York and Washington.
- Thomas T. D. (1976) Regulation of lactose fermentation in group N Streptococci. *Appl. environ. Microbiol.* 32, 474-478.
- Thomas T. D., Turner K. W. and Crow V. L. (1980) Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products and regulation. *J. Bacteriol.* 144, 672-682.
- Thompson J. (1979) Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties *in vivo*. *J. Bacteriol.* 140, 774-785.
- Wijeyewera R. L. and Kleinberg I. (1989a) Acid-base pH curves *in vitro* with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. *Archs oral Biol.* 34, 55-64.
- Wijeyewera R. L. and Kleinberg I. (1989b) Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque *in vitro*. *Archs oral Biol.* 34, 43-53.

" INDICE "

	página
<u>I. SUMARIO.</u> .....	1
a) Palabras Claves .....	1
b) Abreviaciones .....	1
<u>II. INTRODUCCION.</u> .....	3
<u>III. MATERIALES Y METODOS.</u> .....	5
a) Materiales .....	5
b) Población de Pacientes .....	5
c) Colección de Saliva .....	6
d) Contenido de proteína .....	7
e) Purificación de la cistatina SN y preparación del anticuerpo .....	7
f) Inmunocuantización de cistatinas salivales .....	8
g) Actividad inhibidora de la cisteína proteasa .....	9
h) Análisis estadístico .....	10
<u>IV. RESULTADOS.</u> .....	11
a) Sialometría .....	11
b) Contenido de proteína salival .....	11
c) Cuanatización de cistatinas salivales .....	11
d) Actividad inhibidora de la proteasa cisteína .....	12
<u>V. DISCUSION.</u> .....	14
<u>VI. ILUSTRACIONES.</u> .....	18
<u>VII. RECONOCIMIENTO.</u> .....	20
<u>VIII. REFERENCIAS.</u> .....	21

" NIVELES DE CISTATINAS SALIVALES EN SALUD Y ENFERMEDADES

PERIODONTALES EN ADULTOS DE EDAD AVANZADA "

A. Aguirre, L.A. Testa-Weintraub, J.A. Banderas, R. Dunford y M. J. Levine. Departamento de Biología Oral e Instituto de Investigación dental, 109 Foster Hall, Escuela de Medicina Dental, State University de Nueva York en Buffalo.

Buffalo, NY 14214, USA.

( Aceptado 13 Noviembre 1991 )

SUMARIO.

Las cistatinas son inhibidores de proteasa cisteína presente en una variedad de tejidos y fluidos corporales incluyendo la saliva. Una posible función de esas moléculas podría ser la de modular la destrucción de tejidos en enfermedades periodontales. Para investigar el papel potencial de las cistatinas salivales en esos eventos, los niveles de cistatinas en la saliva de individuos periodontalmente sanos o enfermos, se midieron mediante ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas. Los ritmos de flujo y contenido total de proteínas, se determinaron en todas las muestras que se colectaron, mientras que la actividad inhibidora de la proteasa se fijó en secreciones sublinguales-submandibulares. Análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en los niveles y en la actividad de cistatinas salivales en individuos sanos y enfermos periodontalmente; estos resultados sugieren que la comparación de niveles de cistatinas en la saliva glandular puede no ser un indicador adecuado de estado de enfermedad periodontal.

Palabras claves:

Cistatinas, saliva, inhibidor de proteasa cisteína, adultos, periodontitis, envejecimiento.

Abreviaciones: ELISA ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas

SDS-PAGE, gel electrofóresis de sulfato-poliacrildamido-dodecil sódico.

## " INTRODUCCION "

La superfamilia de cistatinas comprende un diverso grupo de inhibidores de proteasa cisteína ampliamente distribuidos en tejidos mamarios y plasma. Ellos protegen al organismo contra la acción incontrolada de proteinazas de cisteína endógenas y/o exógenas (Lindhal et al.,1988).

Originalmente, miembros de la superfamilia de cistatinas se agruparon en tres familias: familia I de estefinas, familia II o cistatinas (incluyendo cistatinas salivales) y familia III o quiniógenas (Barrett et al.,1986ab). De cualquier manera, familias adicionales fueron sugeridas por Rawlings y Barrett (1990) para acomodar aquellas proteínas que no podían ser incluidas en las tres familias establecidas.

Genes de cistatina salival humana son parte de una familia multigene compuesta de siete miembros segregados en el cromosoma 20 (Saitoh et al.,1989). Estos, se reconocieron primero como fosfoproteínas con contenido de cisteína (Shomers et al.,1982a) pero no fué sino hasta recientemente que se identificaron como inhibidores de proteasa cisteína (Isemura, Saitoh y Sanada,1984a 1986, 1987; Isemura et al.,1984b).

Las cistatinas salivales S(SAP-1), SN(SA-I) y SA, contienen 121 amino ácidos y tienen una secuencia homóloga de ~90%.

En adición, las cistatinas salivales tienen una secuencia homóloga del 54% con cistatina serosa C que está presente en el fluido gingival cervical y, consecuentemente, en el medio ambiente oral.

La regulación perjudicada de proteólisis es un aspecto bioquímico importante en la etiología de la enfermedad periodontal (Sandholm, 1986).

Estudios recientes han mostrado niveles incrementados de proteasa cisteína (catepsins D, B y L) con un incremento severo

de inflamación en fluidos cerviculares y homogenatos gingivales parcialmente purificados (Eisenhour et al., y Lah et al., 1986) (Lah et al., 1985).

De la misma manera, homogenatos gingivales obtenidos de sitios periodontalmente enfermos, mostraron una disminución en los niveles de cistatina C que está inversamente corelacionada con el grado de enfermedad periodontal (Skaleric et al., 1989).

De cualquier forma, no ha sido determinado si los niveles de cistatinas salivales glandulares están también asociados con la situación de la enfermedad periodontal. Una asociación debe servir como indicador de la actividad de la enfermedad.

Acordemente, nuestro propósito era ver si hay una corelación entre los niveles de cistatinas salivales glandulares y su actividad inhibidora de proteasa cisteína y el estado periodontal.

## " MATERIALES Y METODOS "

### MATERIALES

Las tazas Lashley fueron de Instrumentaciones H&I (Teaneck NJ, USA). Colectores universales Block-Brotman fueron de Prótesis Dentales Flory (Star City, WV, USA). El ácido cítrico (anhidro), sulfato de amonio, hidróxido de sodio y Brij 35, fueron de la Compañía Científica Fisher (Fair Lawn, NJ, USA). El vinilpolisiloxano del material de impresión (Express light-body set), las varillas mezcladoras pensadoras y disponibles fueron de 3M (St. Paul MN, USA). La papaína (P-3125), fosfato p-nitrofenil disódico, N-x-benzoil-L-arginina-7-amido-4-metilcumarina (B-7260), fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de bovino y albúmina de suero de bovino (A-790) provienen de Sigma (St. Louis, MO, USA), Membranas de nitrocelulosa ( $0.45\mu\text{m}$ ), peroxidasa de rabillo de caballo, suero anjugado de cabra y anti-conejo (IgG H-cadenas) y 4-cloro-1-naftol provienen de Bio-Rat (Richmond, CA, USA). Adyutores completos e incompletos de Freund provienen de GIBCO (Grand Island, NY, USA). Las placas de ELISA (96-well con fondo plano modificado, 25805-96) provienen de Corning Glass Works (Corning, NY, USA).

### POBLACION DE PACIENTES

Individuos clínicamente sanos de ambos sexos (edades de 55-74) fueron reclutados de la población general de Buffalo, NNY, USA. Algunos de estos individuos estaban bajo prescripción médica, en particular, drogas anti-hipertensivas.

Los pacientes seleccionados tenían al menos 16 dientes naturales (dos de los cuales eran molares) sin aparato protésico fijo, obscureciendo la junta de esmalte de cemento y sin previo historial de tratamiento quirúrgico periodontal.



El criterio (Grossi et al., 1990) usado para categorizar el estado periodontal de los sujetos, fué como sigue: el Grupo A consistió en individuos sin periodontitis (todos los dientes tenían una pérdida de unión interproximal de 3 mm o menos); el Grupo B estaba compuesto de individuos con periodontitis moderada a severa (pérdida de unión periodontal de 6 mm o más en los sitios interproximales de al menos dos dientes diferentes).

Todos los participantes fueron escudriñados por un examinador, quien había sido sometido a un entrenamiento adecuado para calibración (Miller et al., 1987).

Un total de 52 sujetos fueron seleccionados, 22 individuos en el grupo A y 30 individuos en el grupo B.

#### COLECCION DE SALIVA

Sujetos que se abstuvieron de comer, beber, fumar de practicar higiene oral por 2 hrs, fueron utilizados para la colección de saliva.

Para coleccionar la saliva submandibular-sublingual, fué usado un aparato comercial Block-Brotman (Block y Brotman, 1962); la saliva parótida fué coleccionada en una taza Lashley (Lashley, 1916).

Las salivas fueron estimuladas mediante la aplicación de 2% de ácido cítrico a los lados de la lengua a intervalos de 30s y el primer mililitro de saliva fué descartado (Baum, 1981).

La saliva se coleccionó en tubos enfriados de polipropileno pre-experimentados, por medio de las cuales, la rapidez de flujo se determinó gravimétricamente y se expresó como ml/mm/glandula. Las salivas fueron después divididas en muestras de 100- $\mu$ l y congeladas a -20°C.

Antes del análisis, las muestras fueron lentamente derretidas en un baño de hielo, y fué añadido Na<sub>2</sub>EDTA para dar una con-

centración final de 5 mM para la saliva submandibular-sublingual y de 1 mM para la saliva parótida (Fox et al., 1986).

### CONTENIDO DE PROTEINA

El total de proteína contenida en las muestras salivales fué determinado por la absorbencia a 215 nm, como lo descrito por Arneberg (1971).

### PURIFICACION DE LA CISTATINA SN Y PREPARACION DEL ANTICUERPO

La cistatina salival SN fué purificada (Al-Hashimi, Cickinon y Levine, 1988; Ramasubbu et al., 1991) para ser usada como inmunógeno para elevar anticuerpos policlonales y como una norma para pruebas ELISA y de inhibición de preteasa cisteína.

El contenido de proteína de las preparaciones de cistatina se determinó mediante un análisis de amino ácidos (Al-Hashimi et al., 1988).

Para obtener una antisera policlonal monoespecífica, 6 conejos blancos femeninos, viejos y débiles, de Nueva Zelanda fueron inmunizados como lo describió Aguirre et al., (1987).

En breve, inyecciones dorsales subcutáneas de cistatina SN (200 µg proteína/ml 0.154 M NaCl) emulsificadas con un adyutor completo de Freund (1:1,v/v) fueron usadas para preparar a los animales.

Inyecciones subcutáneas impulsadoras se dieron ante 6 débiles intervalos con 100 µg proteína/ml de 0.154 M NaCl emulsificadas con un adyutor incompleto de Freund.

Después de 10 días, métodos analíticos "titre" fueron monitoreados mediante SDS-PAGE (Laemmili 1970) y PAGE aniónico (Ornstein 1964) seguidos mediante un inmunosecante (Towbin, Staehelin y Gordon 1979).

Esto demostró que el anisero de conejo (disolución: 1/60,000) era específica para las cistatinas salivales como se mostró mediante la presencia de enlaces solos en ambas salivas con movilidad comparable a la cistatina purificada SN [Placa Fig.1] (B)].

Mas adelante, PAGE aniónico/inmunosecante, reveló que este antisuero reconoció varios miembros de la familia de cistatinas salivales y no era reactivo con amilasa [Placa Fig.2 (B)].

Para ELISA, fracciones concentradas de IgG fueron obtenidas por precipitación de sulfato de amonio (Beutner et al.,1987) y subsecuentemente, conjugado con fosfatasa alcalina (Voller-Bidwell y Brtlett, 1976).

#### INMUNOCUANTIZACION DE CISTATINAS SALIVALES

Las cistatinas salivales fueron cuantificadas mediante una técnica sandwich de ELISA de doble anticuerpo en placas 96-well.

En breve, las placas fueron, primero, cubiertas con fracciones de IgG (1:500 en 0.05 M NaCl bufer de carbonato de sodio, pH 9.6) e incubadas a 37°C por 2 hrs.

Después de lavarlas, (0.154 M NaCl, 0.05% Tween-20) muestras de saliva fueron examinadas ante tres diluciones diferentes, cada una triplicada.

Curvas normales se generaron usando cantidades conocidas de cistatina SN (0.06-2.1 mg de proteína, cada uno triplicado).

Las placas, fueron después incubadas durante la noche a 25°C.

Después de otro lavado, el fosfato p-nitrofenil sódico (1 mg/ml de 0.05 M de bufer de carbonato de sodio, pH 9.8 con 1 mM  $MgCl_2$ ) fué añadido para desarrollo de "colour", e incubado por 60 min a 25°C.

Las placas fueron leídas a 405 nm en un Lectora ELISA 2550 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) interfazada a una computadora

Macintosh.

Los valores de la cistatina salival se obtuvieron de la línea de regresión derivada de las medidas (Mac Reader<sup>TM</sup> Programa 0.2) y los resultados expresados como  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de saliva,  $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$  o  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de la proteína salival total.

Para monitorear la reproducibilidad día a día de las pruebas, las salivas submandibular-sublingual y parótida estimuladas con 2% de ácido cítrico de cuatro sujetos clínicamente saludables, fueron subdivididas en agrupaciones y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Estas muestras fueron usadas como controles para todas las proteínas subsecuentes y pruebas ELISA.

#### ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA CISTEINA PROTEASA

La actividad inhibidora de la proteasa cisteína de las salivas fué determinada mediante una modificación del procedimiento de Barrett Y Krische (1981).

El volúmen de la saliva submandibular-sublingual usada, se basó sobre la concentración de cistatina previamente determinada inmunológicamente.

así como los antecedentes inmunológicos indicaron que los volúmenes largos de saliva parótida serían requeridos, sólo la submandibular-sublingual ( $n=44$ ) fué examinada.

Para cada muestra, cinco concentraciones diferentes de cistatina (0.62; 1.25; 2.5; 5.0 y  $10\mu\text{g}$ , cada uno en duplicado) fueron mezcladas con  $200\mu\text{l}$  de 0.4 M de fosfato de potasio sódico. pH 6.0 conteniendo 8 mM de ditioneol y 4 mM de EDTA.

Papaína (0.4 unidades en 0.1% de Brij 35) fué añadida y las soluciones, incubadas por 10 min a  $40^{\circ}\text{C}$ .

Subsecuentemente,  $250\mu\text{l}$  de una solución preparada recientemente conteniendo 20 M de N-x-benzoil-l-arginina-7-amido-4-metil-

cumarina ( en agua destilada) fueron añadidas e incubadas por 10 min a 40°C.

La reacción enzimática se terminó mediante la adición de 0.1 M de monocloracetato de sodio en 0.1 M de acetato sódico pH 4.0/

La liberación del N-x-benzoil-L-arginina-7-amido-4-metilcumarina se determinó mediante un espectroscopio de fluorescencia, (longitud de onda de la excitación = 345 nm; longitud de onda de la emisión = 438 nm) en un espectrofotómetro de fluorescencia 650-40 (Perkin - Elmer, Norwalk. CT, USA).

#### ANALISIS ESTADISTICO

La prueba-U no paramétrica Mann-Whitney se utilizó para analizar los datos. Las variables evaluadas fueron: proporción de flujo salival (ml/min glándula), concentraciones de proteína (mg/ml), concentraciones de cistatina salival ( $\mu$ g/ml), proporción de secreción de cistatina salival ( $\mu$ g/ml/min) y el contenido de cistatina por total de proteína salival ( $\mu$ g/ml proteína).

Estas variables, se determinaron para ambas salivas. En adición, una examinación de la actividad inhibidora de la proteasa-cisteína para saliva submandibular-sublingual fué hecha.

Debido a que variads pruebas estadísticas para niveles variables comprendiendo cistatina salival fueron hechas, un nivel significativo de 1% se escogió para reducir el riesgo de un error estadística del tipo I.

## " RESULTADOS "

### SIALOMETRIA

El promedio de la proporción de flujo salival (ml/min/glándula) para sujetos sanos y enfermos periodontalmente se muestran en la Tabla 1.

Diferencias no significantes fueron encontradas en la proporción de flujo de la saliva parótida ( $p=0.7248$ ) y submandibular-sublingual ( $p=0.8679$ ), entre sujetos periodontalmente sanos y enfermos.

### CONTENIDO DE PROTEINA SALIVAL

Concentraciones de proteína por el método Arneberg, son mostradas en la Tabla 1.

No se observaron diferencias estadísticamente significantes entre los sujetos periodontalmente sanos y enfermos (saliva submandibular-sublingual  $p=0.3951$ ; saliva parótida  $p=0.3083$ ).

### CUANTIZACION DE CISTATINAS SALIVALES

La cuantización inmunoquímica de cistatinas en la saliva submandibular-sublingual reveló un valor medio de  $129.7 \pm 100.9$   $\mu\text{g/ml}$  para sujetos sin enfermedad periodontal (grupo A) y  $92.0 \pm 58.1$   $\mu\text{g/ml}$  para sujetos con enfermedad periodontal (grupo B).

La concentración de cistatina en la saliva parótida tuvo un valor medio de  $1.6 \pm 2.0$   $\mu\text{g/ml}$  para el grupo A ( $n=22$ ) y  $1.2 \pm 1.8$   $\mu\text{g/ml}$  para el grupo B ( $n=30$ ), casi 100 veces menos que en la saliva submandibular-sublingual (Texto Fig.3).

El SD para ambas secreciones, bastante largo, indicó una amplia variación individual en concentraciones de cistatina (Texto Fig.3).

De cualquier forma, no se observaron diferencias estadísticamente significantes entre los grupos A y B (saliva submandibular-sublingual:  $p=0.1537$ ; saliva parótida:  $p=0.5784$ ).

El anticuerpo utilizado para estos estudios, reacciona cruzadamente con cistatina S, SA y SN [Placa Fig.2 (B)].

Por lo tanto, las cantidades relativas de estas cistatinas diferentes en las salivas no pudieron ser distinguidas.

La distribución de la proporción de secreción de cistatina ( $\mu\text{g/ml/min}$ ) para ambas salivas fué también hecha (Tabla 2).

Nuevamente, diferencias significantes no fueron observadas entre los grupos A y B (saliva submandibular-sublingual:  $p=0.1537$ ; saliva parótida:  $p=0.5784$ ).

Similarmente, diferencias estadísticamente significantes no fueron observadas entre los grupos A y B cuando el contenido de cistatina salival se expresó en base al contenido total de la proteína salival (saliva submandibular-sublingual:  $p=0.0820$ ; saliva parótida:  $p=0.3544$ ; Tabla 2).

### ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA PROTEASA CISTEINA

Subsecuentemente, se realizaron estudios para determinar si la cuantización inmunoquímica de cistatinas corelacionadas con la actividad biológica de esas proteínas en la saliva estaban relacionadas entre ellas.

Bajo nuestras condiciones de prueba  $\sim 10 \mu\text{g}$  de cistatina salival SN purificada fueron requeridos para dar una inhibición del 100% de la actividad de la papaína.

Por lo tanto, para cada muestra submandibular-sublingual, porciones conteniendo variadas cantidades de cistatina (0.62-10  $\mu$ g) fueron probadas.

Un escudriñamiento preliminar del dato mostrado que completa la inhibición de la actividad de la papaína mediante salivas submandibulares-sublinguales, fué directamente corelacionado a una concentración de cistatina salival.

Como lo mostrado en el Texto Fig.4, cada dato anotado representa el volúmen de aquella saliva de una sólo individuo. la cual se necesitó para lograr una inhibición del 100% de la actividad de papaína.

Una amplia variación individual en la actividad de inhibición de la proteasa cisteína, se observó en sujetos periodontalmente sanos (Grupo A) y enfermos (Grupo B).

De cualquier forma, allí no hubo diferencias estadísticamente significantes entre los dos grupos para las cantidades de cistatina requeridas para dar una inhibición del 100% de la actividad de la papaína.



## " DISCUSION "

Nuestros datos para la proporción de flujo de saliva parótida estimulada (0.34 ml/min glándula; n=52) son aproximadamente, los mismos que aquellos obtenidos en diversos estudios anteriores (Ben-Aryeh et al., 1986; Wolf et al., 1990; Ship, Fox y Baum, 1991), pero no son menores que aquellos reportados por otros (Benedeck-Spat, 1973; Baum, 1981; Heft y Baum, 1984).

Así mismo, el promedio de la proporción de flujo para la saliva submandibular-sublingual estimulada ( $\bar{x}$ =0.31 ml/min/ glándula; n=50), fué similar a aquél reportado por diversos grupos (Tylenda et al., 1988; Wolf et al., 1990; Ship et al., 1991).

En contraste, nuestros datos fueron más altos que aquellos reportados por Pedersen et al. (1985), pero más bajos que aquellos reportados por Ericson, Hedin y Wiberg (1972).

Las diferencias entre estos estudios de cruce seccional, podrían ser el resultado de diversos factores incluyendo la colección de aparatos/técnicos o del tipo y frecuencia de simulación gustativa.

Otro factor a considerar, es el consumo de medicamentos prescritos y no prescritos, muchos de los cuales, han sido asociados con la hipofunción de la glándula salival (Sreebny y Schwartz, 1986).

Interesantemente, el uso de medicamentos prescritos por algunas de nuestros sujetos, no tuvieron un efecto aparente en las proporciones de flujo salival, como se demostró mediante la segregación y comparación de datos entre los grupos medicados y no medicados (datos no mostrados).

Para el análisis de la concentración total de proteína en salivas humanas, los métodos Lowry y Arneberg, han sido utilizados.

EL método Lowry es dependiente de la presencia de amino ácidos aromáticos (Lowry et al., 1951), mientras que el método Arneberg se apoya en la asorbencia de enlace péptido a 215 nm (Arneberg, 1971).

Debido a que la prueba Lowry tiende a menospreciar el total del contenido de proteína de las muestras de saliva, escogimos el método Arneberg, el cual ha sido adaptado para usarse con pequeñas cantidades de fluidos salivales (Johnson y Cortez, 1988).

Nuestros datos del total de la concentración de proteína en la saliva parótida ( $\bar{x}$ =3.01 mg/ml; n=52) fueron similares a aquellas ( $\bar{x}$ =2.87 mg/ml n=50) reportadas por Baum (1981) en las cuales, una población con un rango de edad de 60-88 años fué escudriñada.

Nosotros usamos el método Arneberg sugiriendo que provee una técnica confiable y reproducible para la distribución de la concentración del total de proteína salival.

La mayoría de las cistatinas (S, SA y SN) en toda la saliva, provienen de las glándulas salivales, mientras que la pequeña cantidad de cistatina C es derivada, probablemente, del fluido cervicular (Skaleric et al., 1989).

Nuestros descubrimientos son similares a aquellos obtenidos por Shomers et al., (1982b), quien usó una inmunolectroforesis ascendente para determinar los niveles de cistatina salival.

En ese estudio, la concentración de cistatina en la saliva submandibular-sublingual fué  $163 \pm 137 \mu\text{g/ml}$  (n=30) y en la saliva parótida  $5.023.3 \mu\text{g/ml}$  (n=15).

En el parénquima "acinar" de las glándulas parótidas saludables está compuesto exclusivamente por células serosas mientras que las glándulas submandibular y sublingual contienen células mucosas así como serosas.

Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que las cistatinas salivales son producidas en las células serosas de las glándulas parótidas y submandibular (Isemura et al., 1984b; Bobek, Aguirre y Levine, 1991).

Nuestros datos y aquéllos reportados por Shomers et al., (1982b) indican que la saliva humana submandibular-sublingual contiene aproximadamente 100 veces tanta cistatina como la saliva parótida.

Estos hallazgos son sostenidos por el trabajo de Rathman et al. (1990), quien encontró que la actividad inhibidora de la proteasa cisteína de la saliva submandibular, fué mucho más alta que aquella de los fluídos parótidos.

Estudios de inhibición "in situ" han mostrado un contenido más alto de traslados de cistatina en la glándula submandibular humana que en la parótida (Bobek, Aguirre y Levine, 1991).

estas observaciones con algo perplejas debido a que la parótida contiene una mayor abundancia de células "acinares" serosas.

Los eventos moleculares responsables de esta diferencia, persisten para ser elucidados.

Un estudio de Ship et al. (1991) sugiere que estudios longitudinales de secreciones salivales que examina cambios individuales fuera de tiempo, podría proveer una estrategia más apropiada para evaluar el impacto de la saliva en la salud oral.

Sus observaciones se basaron sobre las largas variaciones individuales obtenidas en estudios sialoquímicas de secreciones en cruz.

Así, monitoreando los niveles de cistatina salival de individuos fuera de tiempo, podrían proveer un mejor indicadpr del estado de salud que las comparaciones hechas con los estudios de secreciones cruzadas.

Todavía, tales mediciones longitudinales no pueden proveer un indicador suficientemente penetrante del estado de enfermedad periodontal.

Podría ser necesario monitorear el fluido cervicular para las cistatinas de suero.

Por ejemplo, una participación de cistatina de suero en la modulación de las enfermedades periodontales fué sugerida por Skaleric et al. (1989), quienes encontró una correlación inversa entre los niveles de cistatina C en homogenatos gingivales y el y el grado de gingivitis y periodontitis.

Estudios más amplios están en camino a explorar estas posibilidades.

" INDICE "

	página
<u>I.- SUMARIO</u> .....	1
a) Palabras Claves .....	1
b) Abreviaturas .....	1
<u>II.- INTRODUCCION</u> .....	2
<u>III.- MATERIALES Y METODOS</u> .....	4
a) Purificación de las proteínas .....	4
b) Adsorción y crecimiento de cristal de hidroxiapatita .....	7
<u>IV.- RESULTADOS</u> .....	10
<u>V.- DISCUSION</u> .....	13
<u>VI.- ILUSTRACIONES</u> .....	18
<u>VII.- RECONOCIMIENTO</u> .....	19
<u>VIII.- REFERENCIAS</u> .....	20

" LOS EFECTOS DE LAS CISTATINAS Y ESTATERINA SALIVALES  
HUMANAS EN LA CRISTALIZACION DE LA HIDROXIAPATITA "

M. Johnsson, C.F. Richardson, E.J. Bergey, M.J. Levine y G.H. Nancollas. Departamentos de Química, Biomateriales y Biología Oral. State University de Nueva York en Buffalo.

Buffalo, NY 14214, USA  
( Aceptado 28 marzo 1991 )

SUMARIO.

La adsorción en superficies de hidroxiapatita de cistatina inactiva SN, cistatina acídica S y el contenido de fosfoserina en cistatina acídica SI, fué comparada con la de estaterina. Los efectos de estas proteínas adsorbidas en el crecimiento dinámico de constante composición de hidroxiapatita fueron también estudiados. La cistatina inactiva SN tiene una más alta adsorción máxima que las cistatinas acídicas S y SI. Aunque la afinidad de cistatina para superficies hidroxiapatitas fué más baja que aquella de estaterina, su influencia en la acrecentada dinámica de hidroxiapatita fué considerablemente mayor, con la cistatina acídica SI siendo la más activa. Ante una concentración de superficie de  $7.0 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$  de hidroxiapatita, las cistatinas decrecieron el rango de crecimiento cristalino en un 80 - 95% como se comparó con aquella en ausencia de proteína. Ante esta concentración, la estaterina mostró una inhibición de crecimiento del 40%

Palabras Claves:

Cistatinas, estaterina, adsorción, cristalización, hidroxiapatita.

Abreviaturas:

PTH, feniltioidanción; SDS-PAGE, gel electrofóresis de sulfato-poliacrildamido-dodecil sódico; FPLC, cromatografía líquida de proteína rápida.

## " INTRODUCCION "

Muchas proteínas salivales humanas previenen la excesiva re y desmineralización de superficies esmaltadas por la participación en la formación de película esmaltada obtenida. Las mejor caracterizadas de éstas son la estaterina conteniendo fosfoserina (Schelsinger y Hay, 1977) y las proteínas ricas en prolina (Hay et al., 1988; Kousvelari et al., 1980).

En general, fosfoproteínas, y especialmente aquellas con un contenido de amino ácido aniónico, adsorben fuertemente en dirección hacia la hidroxiapatita y de este modo, inhiben la cristalización (Bennick, Cannon y Madapallimattam, 1979; Moreno, Varughese y Hay, 1979; Schelsinger et al., 1987).

La estaterina y las proteínas ricas en prolina tienen un número de residuos con grupos laterales negativos en las porciones de terminal-N de las moléculas (Schelsinger y Hay 1977; Bennick 1982) que son aptas para estar en contacto con la solución del contorno y accesible para la adsorción de hidroxiapatita. Otras moléculas salivales con varios residuos negativamente cargados en cercana proximidad hacia otra, pueden también tener altas afinidades por superficies apatitas y cristalización inhibida apreciable.

Isemura et al. encontró diversas cistatinas en la saliva, una siendo la cistatina ácida S (Isemura, Saitoh y Sanada 1984) y otra de cistatina inactiva o neutra SN (Isemura, Saitoh y Sanada 1986). Ambas moléculas tienen diversos residuos cargados en su término-N y de este modo, sería posible unir fuertemente hacia la hidroxiapatita.

Las cistatinas son similares a las fosfoproteínas con contenido de cistatina descritas por Shomers et al. (1982a,b,c) y Al-Hashimi, Dickinson y Levine (1988) que han sido mostradas para ser unidas fuertemente a superficies de apatita. En adición, una larga forma de la cistatina SN no fosforilada previamente denominada cistatina SA-1, es también detectada en la película esmaltada 2-h "in vivo" (Al-Hashimi y Levine, 1989).

Ahora, hemos examinado la adsorción en superficies de hidroxiapatita de una gran forma de la cistatina inactiva SN, de la cistatina acídica S y de la cistatina acídica, S1 conteniendo fosfoserina. Y comparando esto con la adsorción de estaterina que ha sido como un patrón positivo (Moreno, Kresak y Hay 1978,1984).

La influencia de estas proteínas preadsorbidas en la mineralización de hidroxiapatita se determina usando el método de composición constante (Thomson y Nancollas, 1978).



## " MATERIALES Y METODOS "

### PURIFICACION DE LAS PROTEINAS

Las cistatinas salivales y estaterina fueron aisladas de la saliva submandibular-sublingual de una donante femenina de 30 años de edad. La saliva se colectó y se procesó según Shomers et al. (1982) y Ramasubbu et al. (1991).

En todos los pasos cromatográficos subsecuentes, las fracciones reunidas fueron diaisladas extensivamente contra agua fría destilada usando el sistema de tubos "Spectra Por 3" y después, liofilizadas.

El fraccionamiento inicial de saliva, se efectuó por cromatografía de columna por el método "Sephodex G-200". La saliva liofilizada (430 mg) se disolvió en 40 mg ml<sup>-1</sup> en 6 mol l<sup>-1</sup> de guanidina-HCl en 100 mmol l<sup>-1</sup> tris-HCl, pH 7.5, y sujeta a la filtración de gel a temperatura ambiente en una columna de Sephadex G-200 (2.6 x 95 cm), que había sido equilibrada con el mismo bufer de guanidina.

Fracciones de seis mililitros fueron colectadas en un flujo a razón de 4 ml h<sup>-1</sup> y cuatro agrupaciones (A-D) fueron hechas, basadas en una absorbencia de 280 nm.

Cistatinas ácidas y neutras fueron purificadas desde el grupo C modificando nuestros procedimientos previamente descritos (Shomers et al., 1982; Al-Hashimi et al., 1988); la estaterina fué preparada del grupo D. Todos estos pasos cromatográficos fueron realizados a 6°C.

El grupo C (600 mg) fué suspendido en 50 ml de 5 mmol l<sup>-1</sup> tris-HCl ante un pH 7.6, agitado a 4°C por 30 min., dialisado contra el mismo bufer durante la noche y centrifugado a 12,000 g para remover cualquier material no disuelto.

Lo que sobrenadaba, fué aplicado a una columna (2.5 x 50 cm) de celulosa DE-52 y eludido inicialmente con 5 mmol l<sup>-1</sup> tris-HCl ante un pH 7.6.

La cistatina neutra fué eludida utilizando un gradiente lineal consistiendo en 500 ml cada uno de 5 mmol  $l^{-1}$  tris-HCl ante un pH 7.6.

Después de lavar con otros 500 ml de 100 mmol  $l^{-1}$  tris-HCl pH 7.6, las cistatinas ácidas fueron eludidas con un gradiente lineal de sal, consistiendo en 500 ml por cada 100 mmol  $l^{-1}$  tris-HCl pH 7.6, y el mismo bufer conteniendo 1 mol  $l^{-1}$  NaCl.

Fracciones (7.2 ml) fueron colectadas ante un flujo a razón de 50-60 ml  $h^{-1}$  y los eluatos fueron monitoreados por absorbencia a 280 nm.

Las cistatinas ácidas eludidas en aproximadamente 0.4 mol  $l^{-1}$  NaCl, fueron separadas mas adelante por medio de una cromatografía en una columna larga (1.5 x 120 cm) de celulosa DE-52 usando un gradiente lineal superficial de 1000 ml cada 100 mmol  $l^{-1}$  tris-HCl pH 7.6, y el mismo bufer conteniendo 0.2 mol  $l^{-1}$  NaCl.

Fracciones de 7.2 ml se colectaron en un flujo a razón de 15-20 ml  $h^{-1}$  y monitoreados por medidas de absorbencia a 280 nm.

Se obtuvieron tres isoformas de cistatinas ácidas y su purificación final se efectuó a temperatura ambiente usando un sistema "Pharmacia FPLC" con columnas de intercambio de aniones Mono-Q HR5/54. Aquí, las muestras (10 mg  $ml^{-1}$  en 0.01 mol  $l^{-1}$  tris-HCl pH 8.0) en un flujo a razón de 1 ml  $min^{-1}$  sobre 30 min. Columnas eluentes de monitorearon a 230 nm.

Para la purificación de estateterina, el grupo D (11 mg  $ml^{-1}$  en 5 mmol  $l^{-1}$  tris-HCl pH 7.6) se fraccionaron en una columna (2.5 x 50 cm) de celulosa DE-52 y la estateterina fué eludida con los mismos buffers usados por las cistatinas ácidas.

Después de la diálisis y la liofilización, la estateterina se desalinizó aún más usando Sephadex G-50 con 0.02 mol  $l^{-1}$  de ácido acético.

En caso necesario, una purificación adicional de estateterina se efectuó por FPLC usando los gradientes empleados para las cistatinas ácidas.

La pureza de las preparaciones de cistatina y estateterina fué determinada por SDS-PAGE (al-Hashimi et al., 1988) análisis de aminoácidos y secuencia de terminal-N.

La composición de los aminoácidos se determinó después de una hidrólisis a 110°C por 24 h al vacío, con un analizador de aminoácidos "Beckman 6300".

La continuidad de la terminal-N se efectuó por el análisis de degradación "Edman" en una secuenciadora de proteínas modelo 471 A (Biosistemas Aplicados, Foster City, CA, USA).

Los aminoácidos-PTH resultantes se identificaron mediante cromatografía de fase reversiva con un analizador PTH isocrático en línea.

La cistatina ( $0.5-1.0 \times 10^{-9}$  mol), disuelta en  $20 \times 10^{-6}$  l de agua desionizada, se secó en un filtro de fibra de vidrio con ácido trifluoroacético tratada y preconditionada con  $3 \times 10^{-3}$  g de Bioberne-Plus (Biosistemas aplicados, Foster City, CA USA).

El promedio de todo el rendimiento fué de 50-60% del total de proteína cargada con un ciclo repetitivo de rendimiento mayor a 93% sobre 35 ciclos.

La presencia de fosfoserina en las regiones de terminal-N de cistatinas acídicas, se determinó midiendo su conversión a etilcisteína (Meyer et al., 1987). Esto se realizó por adición de  $1.0 \times 10^{-4}$  l de mezcla reactiva consistiendo en  $8.0 \times 10^{-5}$  l de etanol,  $6.5 \times 10^{-5}$  l de  $5 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH,  $6.0 \times 10^{-5}$  l de etanetiol (J.T. Baker) y  $4.0 \times 10^{-4}$  l de agua de muestras disecadas ( $2 \times 10^{-9}$  mol) en  $1.0 \times 10^{-3}$  l en ampollita de reacción (Pierce Chemical Co. Rockford, IL)

La mezcla se incubó por 1 h a 50°C en nitrógeno, y después se acidificó con  $1.0 \times 10^{-5}$  l de  $1 \text{ mol l}^{-1}$  de ácido acético.

La presencia de etilcisteína-S se confirmó por la serie de terminal-N de la cistatina derivada, como se describió anteriormente.

El contenido total de fosfato de las cistatinas salivales

y estaterina, se determinó por medio de un espectroscopio nuclear-P de resonancia magnética, como el descrito por Vogel y Bridger (1982) y Ramsabhu et al. (1991).

#### ADSORCION Y CRECIMIENTO DE CRISTAL DE HIDROXIAPATITA

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las concentraciones de iones de calcio se determinaron por el espectroscopio de absorción atómica (Perkin Elmer 503) usando una columna intercambiadora de iones catiónica "Dowex 50W-8 en forma de hidrógeno con titulación de los iones de hidrógeno intercambiados contra soluciones estandarizadas de hidróxido de potasio.

Las soluciones de fosfato de potasio dihidrogenado se analizaron espectroscópicamente con complejo de vanadomolibdato (Tomson, Barone y Nancollas 1977) o mediante titulación de hidróxido de potasio.

Las semillas de cristales de hidroxiapatita se prepararon como describió Johnsson et al. (1991). El área específica de la superficie determinada por adsorción de nitrógeno BET (Brunauer-Emmett-Teller), fué  $29.2 \pm 0.3 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  (30/70, N<sub>2</sub>/He Quantasorb, Quantachrome).

El tamaño de las partículas de las semillas de cristal se encontraron mediante un microscopio de exploración de electrones (Cambridge S-90B) para menos de  $5.0 \times 10^{-7} \text{ m}$ . La relación molar de fosfato de calcio fué  $1.65 \pm 0.05$ .

Los cristales se caracterizaron mediante rayos-X de difracción de polvo (Nicolet/Nic con un aditamento Stoe usando un detector de posición sensitiva en el modo de transmisión).

En los experimentos de adsorción, cantidades conocidas de proteína disuelta se equilibraron por más de 4h en soluciones saturadas de hidroxiapatita a pH 7.4 y fuerza iónica de  $0.15 \text{ mol l}^{-1}$ , usando  $1.20 \times 10^{-3} \text{ g}$  de cristales en tubos de policarbonato

con  $1.00-2.00 \times 10^{-3} \text{ l}$  de solución. El mayor número de experimentos de adsorción se hizo con  $1 \times 10^{-3} \text{ g}$  de cristallitos en  $1 \times 10^{-3} \text{ l}$ .

Diferentes cantidades de hidroxiapatita y diferentes volúmenes se usaron en experimentos paralelos para confirmar que los resultados fueron independientes de la concentración.

Soluciones saturadas de hidroxiapatita se prepararon mezclando fosfato de amonio y soluciones de nitrato de calcio en  $0.5 \text{ mol l}^{-1}$  de cloruro de sodio. El pH se mantuvo en 7.4 añadiendo ácido nítrico e hidróxido de potasio.

Para evitar la degradación bacterial durante la equilibración, todas las soluciones de proteínas se hicieron con  $0.1\% 1,1$  de tricloro-2metilo-2propanol como parte del medio iónico.

El tiempo de incubación fué usualmente 4h a  $37^\circ\text{C}$ .

Los cristales resultantes se separaron de la solución de proteínas por centrifugación a  $250 \text{ g}$  por 10 min a temperatura ambiente, lavados con una solución saturada de hidroxiapatita y resuspendidos antes de usarse en los experimentos de cristalización.

Las concentraciones iniciales y finales de proteína se midieron mediante un análisis de aminoácidos (analizador de aminoácidos Beckman 6300).

En experimentos paralelos sin cristallitos, la adsorción por proteínas mediante superficies de policarbonato resultó ser insignificante.

Los experimentos de cristalización se realizaron mediante el método de composición constante en vasos de doble pared a  $37^\circ\text{C}$ .

Soluciones de  $0.15 \text{ mol l}^{-1}$  de fuerza iónica, sobresaturados con respecto a la hidroxiapatita, se prepararon mezclando cloruro de calcio, fosfato de potasio dihidrogenado y soluciones de cloruro de sodio. Las concentraciones finales de cloruro de calcio y fosfato de potasio fueron usualmente  $4.00 \times 10^{-4}$  y  $2.40 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , respectivamente, resultando una sobresaturación relativa  $\sigma = 3.60$ , con respecto a la hidroxiapatita.

$$\text{Aquí, } \sigma^- = [(IP/K_{sp})^{1/9} - 1], \quad (1)$$

$$\text{donde el ión producto, IP, } IP = [(Ca^{2+})^5(PO_4^{3-})^3(OH^-)] \quad (2)$$

y  $K_{sp}$  es el producto de solubilidad de la apatita. En la preparación final de una solución sobresaturada, el pH se elevó a 7.4 mediante la adición cuidadosa de solución de hidróxido de potasio. Experimentos de crecimiento se iniciaron mediante la adición de  $1 \times 10^{-3}$  l de suspensión conteniendo  $5 \times 10^{-3}$  g de semillas de cristales sobre las cuales, las proteínas preparadas como se describió anteriormente, habían sido preadsorbidas.

La proteína tomada de las semillas de los cristallitos se determinó mediante el análisis de la solución antes y después de la adsorción.

Después de la adición de cristales a la solución sobresaturada, todas las concentraciones se mantuvieron constantes durante la mineralización mediante la adición controlada potencialmente de dos soluciones tituladas consistiendo de cloruro de calcio + cloruro de sodio y un fosfato de potasio + hidróxido de potasio con una efectiva concentración titulada de hidroxapatita de  $1.0 \times 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ .

Durante la mineralización, se retiraron muestras filtradas (Millipore  $2.2 \times 10^{-7}$  m) y analizadas con calcio y fosfato para confirmar que la sobresaturación constante se mantuvo.

Experimentos paralelos se realizaron en ausencia de proteína. Todas las reacciones se hicieron por triplicado con un 3% de reproducibilidad a ritmo de crecimiento medido.

## " RESULTADOS "

Las proteínas investigadas incluyeron tres cistatinas y esterinas salivales teniendo las composiciones de aminoácidos dadas en la tabla 1.

La cistatina neutra, que es designada cistatina SA-I por Al-Hashimi et al. (1988), es idéntica en composición a la cistatina SN descrita por Isemura et al. (1986) y Saitoh et al. (1987, 1988). Para eliminar la confusión, esta cistatina inactiva será referida aquí como cistatina SN.

Las tres cistatinas más ácidas (S, S1 y S2), nombradas C1-C3 por Shomers et al. (1982c), eran idénticas entre ellas en sus composiciones de aminoácidos y secuencias de terminal-N y a aquellas de cistatina S (Tabla1) (Isemura et al., 1984c).

De este modo, las diferencias en movilidad aniónica entre las tres cistatinas ácidas fué probablemente debido a los niveles variables de fosforilación (Shomers et al., 1982c).

La molécula más aniónica (Cistatina S2) se encuentra en cantidades muy pequeñas en la saliva y por esto, no fué usada en este estudio.

La derivación de la mayor cistatina ácida (cistatina S1) con etanetiól y una serie de terminal-N subsecuente, indicó que la serina en la posición 3 era fosforilada.

En contraste, otra cistatina ácida (cistatina S), no es menor en eliminación- $\beta$  de residuos de serina indicando que esta proteína no era fosforilada.

Finalmente, cuando menos dos de las cistatinas ácidas representan variantes de cistatina S, la cual difiere en su grado de fosforilación y de esta forma se designan cistatina S (no fosfato) y cistatina S1 (un fosfato).

El residuo 16 de secuencia aminoácida de terminal-N de cistatina S y S1, se encontró para ser Ser-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Asp-Arg-Ile-Ile-Pro-Gly-Gly-Ile-Tyr-Asp-. Esta secuencia difiere de la de la cistatina SN en las posiciones 1,3,7 y 16 donde la cis-

tatina SN tiene Trp, Pro, Asp y Asn respectivamente (Al-Hashimi et al., 1988).

Las cistatinas ácidas e inactivas tienen secuencias idénticas de aminoácidos entre los residuos 17-35. La diferencia en aminoácidos con grupos laterales positivos y negativos entre las cistatinas y estaterinas, se muestran en la Tabla 1.

Los datos de adsorción con hidroxapatita de tres cistatinas, son comparados con estaterina (Fig.1), la cual tiene dos residuos de fosfoserina en las posiciones dos y tres.

La adsorción  $Q(\text{mol m}^{-2})$ , de las cistatinas y estaterina graficada como una función de la concentración de equilibrio  $c(\text{mol l}^{-1})$ , se muestran en la figura 1 y se expresan en términos del modelo de Langmuir (Kresak et al., 1977)

$$C/Q = 1/KN + C/N, \quad (3)$$

en la figura y la Tabla 2.

En la ecuación (3), K es el coeficiente de afinidad ( $1 \text{ mol}^{-1}$ ) y N es el número máximo de sitios de adsorción ( $\text{mol m}^{-2}$ ).

Nuestro dato de adsorción reportado tiene un SD de menos del 5%.

La estaterina tiene un mucho más alto coeficiente de afinidad y máxima adsorción que las cistatinas. La adsorción máxima de estaterina  $N(0.44 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2})$ , es algo menor que el  $0.49 \times 10^{-6}$  publicado por Moreno et al. (1978); también, el coeficiente de afinidad de  $11.3 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1}$  fué menor que los valores reportados anteriormente de  $110 \times 10^5$  y  $111 \times 10^5 \text{ l}$  determinado en soluciones de  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  de concentración iónica] (Moreno et al., 1978; Hay y Moreno, 1979).

Ante una concentración de equilibrio de  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ , la estaterina mostró una adsorción de  $0.4 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ , mientras que las cistatinas adsorbieron entre  $0.10$ - $0.15 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ .

Es de interés que la cistatina inactiva SN mostró una adsorción máxima más alta que las cistatinas S y S1.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Los resultados de los experimentos de crecimiento y composición constante se grafica en la figura 3.

La cistatina A1 fué un inhibidor más efectivo que las cistatinas S o SN, mientras que la inhibición de la estaterina fué de cerca de la mitad que la de las cistatinas.

Ante la concentración de la superficie de  $7.0 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$ , la cistatina S1 inhibió el crecimiento de cristal en un 95%, mientras que las cistatinas S y SN mostraron una inhibición del 85% y 79%, respectivamente.

En esta concentración de la superficie, el valor de la estaterina fué de 40%.

Interesantemente, en las superficies con concentración entre  $0.2 - 0.8 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$ , todas las proteínas mostraron una inhibición menor de crecimiento de cristal, que en las concentraciones de superficies más altas a en las concentraciones de superficies más bajas.

## " DISCUSION "

Diversos inhibidores de cisteína proteinizados, se detectaron en la saliva humana (Saitoh et al., 1988).

La presencia en la película esmaltada adquirida de al menos una de éstas, sugiere que pueden adsorberse a superficies esmaltadas (Al-Hashimi y Levine 1989).

Nosotros mostramos aquí que las cistatinas adsorbieron hidroxapatita con una adsorción máxima aproximadamente del 30-50% de la encontrada en la estaterina (Fig 1, Tabla 2).

El número máximo, de sitios de adsorción, para las cistatinas (Fig.1) era similar a aquella para la proteína 3 rica en prolina, una molécula con tamaño y carga similar (Aoba, Moreno y Hay 1984).

Las cistatinas tienen, de cualquier manera, un coeficiente de afinidad inferior que el de la estaterina o que el de la proteína 3 rica en prolina.

Es de interés que la presencia de un residuo de fosfoserina en la cistatina ácida S1 no incrementó la adsorción máxima o el coeficiente de afinidad significativamente, comparada con la idéntica, mas no fosforilada, cistatina ácida S.

Tampoco la cistatina inactiva SN mostró una diferencia significativa en la afinidad. Aunque tienen diferentes puntos isoelectrónicos, todas las tres moléculas tienen segmentos similares conteniendo varios residuos con grupos laterales cargados en la estructura.

La distribución de residuos cargados parecen ser, por consiguiente, tan importantes para determinar la conducta de adsorción como lo es la presencia de residuos de fosfoserina.

Meyer y Nancollas (1973) sugirieron que la fuerte ligadura de difosfonatos e hidroxapatita podría ser debido a la quelación de calcio superficial mediante grupos cargados negativamente en

cercana proximidad entre ellos.

Si tal ligadura ocurre, varios de los residuos cargados en los segmentos cargados de cistatinas podrían participar en ligaduras similares.

Otros, han sugerido requerimientos estereoquímicos similares para una proteína, que muestra una fuerte ligadura para superficies de hidroxapatita.

Aunque varios residuos cargados se localizan en las partes de terminal-N de ambas, estateterina (Schelsinger y Hay 1977) y las cistatinas, la adsorción máxima, así como la constante afinidad de estateterina, fueron considerablemente más altas que aquellas de las cistatinas.

La más alta adsorción máxima de estateterina refleja las diferencias en tamaño de los dos grupos de proteínas.

La alta afinidad de la estateterina, es probablemente, debida al término-N altamente cargado, juntos, con la gran flexibilidad de estos segmentos como se comparó con partes de igual tamaño de proteína más larga.

La mayoría de las moléculas de estateterina están en forma de rotación- $\beta$  o de espirales casuales (Tseng et al., 1987), que incrementaron la posibilidad de cambios estructurales que pueden influir en la adsorción.

La diferencia entre el coeficiente de afinidad de estateterina en nuestro trabajo y en estudios anteriores (Moreno et al., 1987) puede ser atribuida a una mayor fuerza iónica en nuestro estudio, y de este modo, decreciendo el coeficiente de afinidad.

Por lo tanto, la intersección del eje-y de nuestra adsorción Langmuir para la estateterina fué 1.0 (Fig.2) mientras que en el estudio de Moreno et al. (1978), la intersección eje-y fué de cerca de 1/10 del valor mostrado en la Fig.2.

A valores similares de N, este resultaría en una diferencia de 10 veces en el valor de K. Una diferencia en la pendiente de

las gráficas, podría, en consecuencia, dar un muy largo cambio en el valor derivado de K.

Una vez que las moléculas son adsorbidas de una superficie de hidroxiapatita, el potencial de inhibición de cristalización depende del número de sitios de crecimiento que están bloqueados por la proteína y la posibilidad de su desorción de la superficie. El tamaño más grande de las moléculas de cistatina permite un sitio múltiple de ligamentos que hace la desorción menos probable.

La fuerte inhibición de crecimiento de cristales también sugiere que la desorción de las moléculas durante la cristalización es baja.

Las moléculas más grandes de cistatina pueden también cubrir sitios de la superficie más eficientemente que la estaterina más pequeña, acrecentando de este modo la inhibición de crecimiento de cristal.

Encontramos una inhibición creciente con carga de proteínas, con la cistatina S1 de contenido de fosfoserina siendo la más activa. Esto puede sugerir un mejor ligamiento en la superficie, pero la carga más alta podría también disminuir la posibilidad de desorción.

La mayor inhibición de las cistatinas como se compara con aquella de estaterina, indica que las partes más largas o segmentos varios de cada molécula se ligan en sitios de la superficie, ocasionando una mayor efectividad de cobertura.

Interesantes cambios en la inhibición de crecimiento de cristal se observó para todas las proteínas a muy bajas concentraciones superficiales.

A  $0.2-0.8 \times 10^{-8}$  mol  $m^{-2}$ , las propiedades inhibitoras fueron realmente menores que en las concentraciones de la superficie de  $0.1-0.2 \times 10^{-8}$  mol  $m^{-2}$  (Fig.3). Ante concentraciones arriba de  $0.8 \times 10^{-8}$  mol  $m^{-2}$ , la inhibición fué más alta nuevamente.

Este fenómeno no puede ser explicado simplemente comparando las propiedades inhibitoras de una proteína a diferentes concentraciones y la excelente reproducibilidad de nuestros resultados descarta cualquier artefacto de preparación de pruebas.

La presencia de inhibidores no deseados en soluciones de proteína, puede ser también excluida, porque podrían mostrar un efecto de crecimiento con la concentración.

Una posible explicación podría ser la nucleación de hidroxapatita inducida a las superficies de proteína adsorbida en los cristalitos. Campbell y Nancollas (1991) encontraron que esas proteínas adsorbidas en una superficie pueden actuar como sitios de nucleación para precipitación de fosfato de calcio. Tal nucleación, podría probablemente, aumentar con las cantidades de proteína adsorbida, pero la proporción de tal crecimiento es, de cualquier manera, considerablemente menor que aquella de hidroxapatita sembrada perteneciendo a una mucho menos área de superficie disponible.

Consecuentemente, la inhibición debido a la presencia de una proteína podría resultar en una disminución del ritmo de crecimiento global que podría exceder en valor el incremento anticipado debido a la nucleación.

La nucleación podría, por consiguiente, ser detectada en un estudio de cristalización sólo como un grado un poco más bajo de inhibición comparado en condiciones donde no ocurrió nucleación.

Si la nucleación es dependiente de la concentración de la superficie de la proteína, discontinuidades en el grado de inhibición podrían esperarse como estos cambios, ofreciendo una posible explicación para el ritmo de excursión observado en la región  $0.2-0.8 \times 10^{-8}$  mol m<sup>-2</sup>.

Esto, debe indicarse en embargo, que nuestros descubrimientos no demuestran conclusivamente nucleación en las películas de proteínas adsorbidas.

La participación en el proceso de adsorción de los residuos aniónicos en las partes de terminal-N de estaterina y las proteínas ricas en prolina, está bien establecida (Schelsinger et al. 1987; Bennik et al., 1979)/

La presencia de segmentos con una carga alta, podría sugerir dominios de ligaduras similares en las cistatinas y esto, es soportado por el alto grado de inhibición de crecimiento de cristales, como se comparó con la estaterina.

La presencia de esos dominios, puede también resultar en moléculas que tienen un grado bajo de desorción durante los experimentos de crecimiento.

Además, las más baja afinidad de las cistatinas, sugiere que estos ligamentos dominan menos específicamente que aquellos de moléculas de estaterina.

" ILUSTRACIONES "

	Neutral Cystatin SN <sup>a</sup>	Ácida Cystatin S SI <sup>b</sup>	Estaterina <sup>c,d</sup>
Asn	13	13	1
Thr	3	5	1
Ser	7	8	2
Gln	19	23	10
Pro	6	5	7
Gly	5	5	4
Ala	6	7	0
Cys	4	4	0
Val	8	7	1
Met	0	1	0
Ile	6	5	1
Leu	6	8	2
Tyr	6	6	7
Phe	5	6	3
His	2	2	0
Lys	7	5	1
Arg	11	9	3
Trp	3	2	ND <sup>e</sup>
Total:	121	121	43
M:	14056	14190 S	5380
Phosphate	0	0.1	2

Tabla 1. Amino ácidos por molécula de cistatinas salivales SN, S y SI y estaterina.

<sup>a</sup>Al-Hashimi et al. (1988), una larga forma de cistatina salival SN.

<sup>b</sup>Fosfofoserina detectada en la terminal-N posición 3.

<sup>c</sup>Schelsinger y Hay (1977).

<sup>d</sup>Fosfofoserina detectada en la terminal-N posiciones 2 y 3.

<sup>e</sup>ND = no detectado.

	K 10 <sup>-11</sup> mol <sup>-1</sup>	N 10 <sup>-6</sup> mol m <sup>-2</sup>
Estaterina	11.30	0.44
Cystatin SI	4.25	0.16
Cystatin S	4.55	0.15
Cystatin SN	4.20	0.22

Tabla 2. Coeficiente de afinidad (K) y máximo número de sitios de adsorción (N) calculados del Langmuir isotérmico en la ecuación (3) para adsorciones de estaterina y cistatinas en la hidroxiapatita.

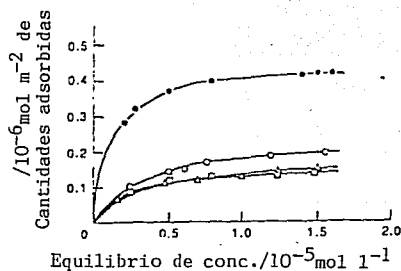


Fig. 1. Adsorción de estaterina (●) cistatina SI (Δ) cistatina S (◻) y cistatina SN (○) en la hidroxiapatita.

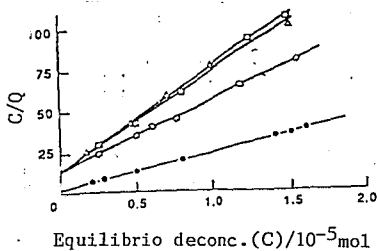


Fig. 2. Adsorción en la hidroxiapatita expresada en una adsorción isotérmica Langmuir de acuerdo con la ecuación (3) para estaterina (●) cistatina SI (Δ) cistatina S (◻) y cistatina SN (○).

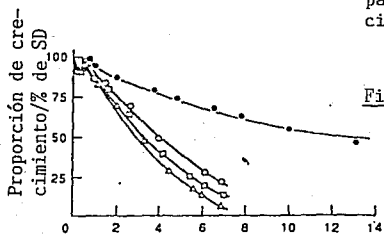


Fig. 3. Efectos de proteínas adsorbidas en la cristalización de hidroxiapatita estaterina (●) cistatina SI (Δ) cistatina S (◻) y cistatina SN (○).

Cantidades Adsorbidas / 10<sup>-8</sup> mol m<sup>-2</sup>

**NO  
EXISTE  
PAGINA**



" REFERENCIAS "

- Al-Hashimi I. and Levine M. J. (1989) Characterization of *in vivo* salivary-derived enamel pellicle. *Archs oral Biol.* 34, 289-295.
- Al-Hashimi I., Dickinson D. P. and Levine M. J. (1985) Purification, molecular cloning and sequencing of salivary cystatin SA-I. *J. Biol. Chem.* 263, 9381-9387.
- Aoba T., Moreno E. C. and Hay D. I. (1984) Inhibition of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. *Calc. Tiss. Int.* 36, 651-655.
- Bennick A. (1982) Salivary proline-rich proteins. *Molec. Cell Biochem.* 45, 83-99.
- Bennick A., Cannon M. and Madapallimattam G. (1979) The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem. J.* 183, 115-126.
- Campbell A. A. and Nancollas G. H. (1991) The mineralization of calcium phosphate on separated salivary protein films. *Coll. Surfaces.* 54, 33-40.
- Hauschka P. V. and Carr S. A. (1982) Calcium-dependent  $\alpha$ -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 21, 2538-2547.
- Hay D. I. and Moreno E. C. (1979) Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatite surfaces. *J. Dent. Res.* 58B, 937-940.
- Hay D. I., Bennick A., Schlesinger D. H., Miraguchi K., Madapallimattam G. and Schluckebier S. K. (1988) The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, P11-1 and P11-F). *Biochem. J.* 255, 15-21.
- Isemura S., Saitoh E. and Sanada K. (1984) Isolation and amino acid sequence of SAP-I, a acidic protein of human whole saliva, and sequence homology with human  $\alpha$ -trypsin. *J. Biochem.* 96, 489-498.
- Isemura S., Saitoh E. and Sanada K. (1985) Characterization of a new cysteine proteinase inhibitor of human saliva, cystatin SN, which is immunologically related to cystatin S. *FEBS Lett.* 198, 145-149.
- Jackson M., Richardson C. F., Sallis J. D. and Nancollas G. H. (1991) Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite. *Calc. Tiss. Int.* In press.
- Kawachi S. E., Barate R. S., Burke B. and Oppenheim F. G. (1989) Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle and glandular tissue specimens. *J. dent. Res.* 69, 1430-1438.
- Kresak M., Moreno E. C., Zahradnik R. T. and D. I. Hay (1977) Adsorption of amino acids onto hydroxyapatite. *J. Cell Biochem. Sci.* 29, 283-292.
- Meyer J. L. and Nancollas G. H. (1973) The influence of  $\gamma$ -tridentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxyapatite. *Calc. Tiss. Res.* 13, 295-303.
- Meyer H. E., Swiderek K., Hoffmann-Pestle E., Korte H. and Heilmayer Jr L. M. G. (1987) Quantitative determination of phosphoserine by high-performance liquid chromatography as the phenylthiocarbonyl-S-ethylcysteine. *J. Chromatogr.* 397, 113-121.
- Moreno E. C., Kresak M. and Hay D. I. (1978) Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy-, and fluorapatites. *Archs oral Biol.* 23, 528-533.
- Moreno E. C., Varughese K. and Hay D. I. (1979) Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calc. Tiss. Int.* 28, 7-16.
- Moreno E. C., Kresak M. and Hay D. I. (1984) Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calc. Tiss. Int.* 36, 47-59.
- Ramasubba N., Reddy M. S., Bergey E. J., Haraszthy G., Tom S. D. and Levine M. J. (1991) Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *in press.*
- Saitoh E., Kim H. S., Smithies O. and Maeda N. (1987) Human cysteine-proteinase inhibitors: nucleotide sequence analysis of three members of the cystatin gene family. *Genes* 61, 329-338.
- Saitoh E., Isemura S., Sanada K., Kim H.-S., Smithies O. and Maeda N. (1988) Cystatin superfamily: Evidence that family II cystatin genes are evolutionarily related to family III cystatin genes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 191-197.
- Schlesinger D. H. and Hay D. I. (1977) Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J. Biol. Chem.* 252, 1659-1695.
- Schlesinger D. H., Buku A., Wyssbrod H. R. and Hay D. I. (1987) Chemical synthesis of phosphoserine-phosphoserine, a partial analogue of human salivary statherin, a protein inhibitor of calcium phosphite precipitation in human saliva. *Int. J. Pept. Res.* 30, 257-262.
- Shomers J. P., Tabak L. A., Levine M. J., Mandel I. D. and Hay D. I. (1982a) Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.* 61, 397-399.
- Shomers J. P., Tabak L. A., Levine M. J., Mandel I. D. and Ellison S. A. (1982b) Characterization of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.* 61, 764-767.
- Shomers J. P., Tabak L. A., Levine M. J., Mandel I. D. and Ellison S. A. (1982c) The isolation of a family of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.* 61, 973-977.
- Tomson M. B. and Nancollas G. H. (1978) Mineralization kinetics: a constant composition approach. *Science* 200, 1059-1061.
- Tomson M. B., Barone J. P. and Nancollas G. H. (1977) Precise calcium phosphate determination. *Atom. Absorp. Newsl.* 16, 117-118.
- Tseng C. C., Loomis R. E., Hay D. I. and Levine M. J. (1987) Secondary structural characterization of a synthetic peptide from a salivary statherin (Special Issue). *J. Dent. Res.* 66 205, abstract No. 1587.
- Vogel H. J. and Bridger W. A. (1982) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the two phosphoserine residues in hen egg white ovalbumin. *Biochemistry* 21, 5625-5631.

REVISION BIBLIOGRAFICA REFERENTE A ARTICULOS:

I.- JOURNAL ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY.

TITULO: COMPRACION DE LOS EFECTOS DE LA GALACTOSA Y-  
LA GLUCOSA EN LAS RESPUESTAS DEL PH DE LA -  
PLACA DENTAL HUMANA, SEDIMIENTO SALIVAL Y --  
CULTIVOS PUROS DE BACTERIA ORAL.

AUTOR: SALARO N. KELINBERG I.

UNIQUE IDENTIFIER: 93074533

AÑO: 1992 OCTUBRE. (JC:83m) 37 (10).

PAGINAS. 821-829

2.- JOURNAL OF DENTAL RESEARCH.

TITULO: LOS EFECTOS DE LAS CISTATINAS Y ESTEARINA SA  
LIVALES HUMANAS EN LA CRISTALIZACION DE LA HIDROXI--  
APATITA.

AUTOR: SMITH D.J. JOSHIPURA K. KENT R.

UNIQUE IDENTIFIER: 93085022

AÑO: 1992 DICIEMBRE. (JC:hyu) 71(12)

PAGINAS. 631-636.

3.- JOURNAL SCANDINAVIAN JORNAL OF DENTAL RESEARCH.

TITULO: NIVELES DE CISTATINA SALIVAL, SALUD PERIODON-  
TAL Y ENFERMEDAD EN ADULTOS.

AUTOR: JOHANSSON BI. LAGER LOF. F.

UNIQUE IDENTIFIER: 9306762.

AÑO: 1992 (JC:ucq) 100(4)

PAGINAS: 355-361