

Adhesión de *Streptococcus mutans* sobre hidroxiapatita *in vitro*

V. M. HIDALGO¹, E. M. BERARDINELLI¹, M. A. BLESA^{2,3}, M. C. APELLA^{1,4}.

¹Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA);

²Unidad de Actividad Química, Comisión Nacional de Energía Atómica;

³Universidad Nacional de San Martín;

⁴Universidad Nacional de Tucumán. Chacabuco 145,
4000 San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina,

Resumen

En el presente trabajo se evalúa la adhesión de *Streptococcus mutans* a hidroxiapatitas de diferente naturaleza en una solución oral sintética. La adhesión microbiana fue determinada indirectamente por recuento de los microorganismos viables en suspensiones equilibradas con los sustratos. Los resultados obtenidos mostraron que, a baja concentración de inóculo, la adhesión de *Streptococcus mutans* puede ser descrita, razonablemente, mediante una única isoterma de Langmuir, introduciendo una pequeña corrección en cada muestra para dar cuenta de las diferencias en la macrorugosidad. La constante de afinidad resultó ser aproximadamente igual a $0,25 \cdot 10^{-8}$ (bacterias/mL)⁻¹. La falta de influencia del sustrato se interpreta en términos del mecanismo de adsorción del *S. mutans*, y el gran tamaño de la bacteria, que disimula diferencias químicas y morfológicas de la superficie en la dimensión nanométrica. Estos resultados sugieren que la derivatización de la superficie con grandes polímeros puede ser una alternativa más útil para modificar la adhesión bacteriana.

A altas concentraciones de inóculo, se dispara una adhesión multicapa, descrita por una ecuación modificada de Hill, con un coeficiente $n = 3$, que indica fuertes interacciones atractivas entre bacterias.

Summary

In this work, the adhesion of *Streptococcus mutans* onto different hydroxyapatite samples in a synthetic oral solution is assessed. Microbial adhesion was determined indirectly, by counting the viable microorganisms in suspensions equilibrated with the substrates. The results show that, a low inoculum concentration, adhesion may be reasonably described by a single Langmuir isotherm, if a small correction is introduced to account for the differences in macrorugosity. The affinity constant was found to be ca. $0.25 \cdot 10^{-8}$ (bacteria/mL)⁻¹. The lack of influence of the substrate is interpreted in terms of the adsorption mechanisms for *S. mutans*, and the large bacterial size, that conceals chemical and morphological differences in the surfaces, at the nanoscale. These results suggest that surface derivatization, using large polymers, may be a more useful way to modify bacterial adhesion.

At high inoculum concentrations, multilayer adhesion is triggered; this type of adhesion is described by a modified Hill equation, with a coefficient $n = 3$, indicating strong attractive interactions among bacteria.

Keywords: Hydroxyapatite, bacterial adsorption, *S. mutans*

Correspondencia:

MC Apella

Universidad Nacional de Tucumán.

Chacabuco 145,

4000 San Miguel de Tucumán,

Tucumán, Argentina,

Email: mapella@cerela.org.ar

Introducción

Los biomateriales cerámicos como la hidroxiapatita (HAP) implantados están sujetos a transformaciones estructurales y microestructurales, algunas de las cuales son beneficiosas pues conducen a la biointegración; otras son nocivas, pues pueden conducir a la destrucción del implante, o a la colonización del mismo por microorganismos con el consiguiente riesgo de infección. Los fenómenos de colonización bacteriana han sido descritos en la literatura, en relación con la formación de biopelículas como por ejemplo la placa dental. Los fenómenos fisicoquímicos subyacentes incluyen interacciones electrostáticas, interacciones específicas (químicas) entre grupos funcionales y la superficie sólida, e interacciones laterales entre las moléculas o los cuerpos que se fijan en la superficie. Existe abundante bibliografía sobre las reacciones interfaciales entre células, bacterianas o tisulares, y biomateriales, y se ha demostrado que la topografía (microestructura) del biomaterial influye fuertemente sobre la capacidad de las células para orientarse, migrar y producir arreglos organizados^[1]. Sin embargo, no hay una comprensión clara de los factores que regulan estos efectos topográficos que deben sin duda depender de fenómenos químicos fuertemente orientados y eventualmente cooperativos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la adhesión* de *Streptococcus mutans*, cariogénico, sobre hidroxiapatitas de naturaleza diferentes y buscar una correlación con sus propiedades

microestructurales y superficiales. El *S. mutans* ha sido asociado sistemáticamente con la formación de placa dental cariogénica^[2], y se ha propuesto usar métodos de inhibición de su adsorción sobre HAP, que conduce a la colonización^[3]. Por ejemplo, se ha propuesto usar anticuerpos contra los dominios de uniones por adhesina^[4]; también se ha propuesto usar ácido poli-L aspártico y otras sustancias poliméricas para modificar las propiedades de la superficie de HAP, y disminuir así su afinidad por el *S. mutans*^[5]. Dentro de lo que hemos encontrado, el presente trabajo es el primer ejemplo de exploración sistemática de la influencia de la forma de obtención de hidroxiapatita sobre la adhesión de *S. mutans*. Para ello se aprovecharon los resultados del Proyecto CYTED VIII.6: "Obtención y Caracterización de Biomateriales Compuestos con Carga de Hidroxiapatito", que condujo a muestras de hidroxiapatita de diversos orígenes y distintas propiedades microestructurales y superficiales.

Materiales y métodos

Materiales usados

Las muestras de hidroxiapatitas fueron provistas por el Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Sao Paulo, Brasil (Secklerita)^[6], el Instituto de Ciencias de Materiales de Barcelona, España (Raritas)^[7] y por el Laboratorio de Biomateriales del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba (Gonzalita)^[8]. La Tabla I muestra el área geométrica y la densidad aparente, promedio de las

Tabla I. Características de los sustratos

SUSTRATO	ÁREA GEOMÉTRICA x 10 ⁻⁸ (μm ²)	DENSIDAD APARENTE (g/cm ³)	FACTOR DE POROSIDAD
Secklerita (S)	2,64	2,88	1
Rarita no funcionaliza (Rnf)	3,53	0,63	1,47
Rarita funcionalizada con acetato (RfAc)	1,17	1,58	1,11
Rarita funcionalizada con citrato (RfCit)	1,17	1,53	1
Rarita deficiente en Ca (RdefCa)	1,71	1,39	0,56
Rarita deficiente en Ca, funcionalizada con acetato (RdefCafAc)	1,02	2,02	0,83
Rarita deficiente en Ca, funcionalizada con citrato (RdefCafCit)	1,02	2,18	0,19
Gonzalita (G)	1,88	1,83	0,67

* Es común distinguir entre adsorción (reversible) y adhesión (irreversible): ver, por ejemplo, Apella MC y Blesa MA, *Fenómenos en la Interfaz Biomeaterial / Células Bacterianas y Tisulares*, en *Biomateriales*, Morales J (es), en prensa. Nosotros usaremos indistintamente ambos términos, aunque probablemente el fenómeno descrito por la ecuación de Langmuir es reversible, y descrito por la ecuación de Hill es irreversible (ver Resultados y Discusión).

muestras analizadas. Se incluye también la porosidad discutida más adelante.

Cepa bacteriana, medios e inóculo para los ensayos de adhesión

Streptococcus mutans ATCC (American Type Culture Collection) 25175, usado como el organismo test, fue cultivado aeróbicamente durante toda una noche en caldo Laptg^[9] a 37 °C. Las células fueron removidas por centrifugación (10.000 g, 30 min), lavadas tres veces con solución reguladora de KCl, pH 6,0^[10] (50 mmol dm⁻³ de KCl, 1 mmol dm⁻³ de KH₂PO₄, 1 mmol dm⁻³ de CaCl₂, 0,1 mmol dm⁻³ de MgCl₂) y resuspendidas en 3 mL de la solución reguladora de manera tal de tener un inóculo inicial de bacterias con una concentración del orden de 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

Preparación de los sustratos

Las pastillas cilíndricas de hidroxiapatitas, colocadas en tubos, fueron equilibradas sucesivamente con 1 mL de solución reguladora de KCl durante 18 h y solución oral sintética NAF (1 % p/v de hidroxipopil metil celulosa, 4,7 % de p/v xilitol, 0,1 % p/v de KCl y NaCl, 0,0002 % p/v de NaF, 0,005 % p/v de MgCl₂, 0,015 % p/v de CaCl₂, 0,040 % p/v de K₂SO₄, pH: 7,0) durante 2 h a temperatura ambiente y a 18 h a 4°C. Posteriormente fueron lavadas tres veces con la solución reguladora.

Ensayos de adhesión

Las pastillas se pusieron en contacto con 3 mL de cultivo bacteriano durante 1,30 h, tiempo sugerido para que tenga lugar la adhesión sobre las superficies de biomateriales, y teniendo en cuenta que en dicho lapso el crecimiento bacteriano es despreciable. Se evaluó la adhesión bacteriana, determinado el número de microorganismos viables antes y después del contacto mediante el recuento en placas de Laptg agar.

Movilidades electroforéticas:

Los potenciales zeta de las partículas de seckleritas y raritas no funcionalizadas se midieron en solución acuosa, fuerza iónica 0,01 mol dm⁻³ (KNO₃), y en solución oral sintética NAF con un equipo PENKEM 3000.

Resultados y discusión

La adhesión bacteriana sobre cada uno de los sustratos se determinó en función de la concen-

tración remanente de *S. mutans*. El número de bacterias, medido como UFC, removidas de la solución, fue transformado en valores de número de bacterias adheridas por unidad de área de la pastilla de sustrato. Se usó en todos los casos el área geométrica.

En principio, cada sustrato fue analizado individualmente; sin embargo, en algunos casos no se dispone de mediciones en cantidad suficiente como para deducir la relación funcional entre la densidad superficial y la concentración remanente. Los resultados obtenidos para todos los sustratos, a valores relativamente bajos de concentración de bacterias en solución, pudo aproximarse con una sola ecuación de Langmuir, aceptando que en cada caso el área geométrica debía corregirse por la rugosidad y la porosidad. Este procedimiento es equivalente a aceptar que la afinidad de todas las pastillas fue similar, pero que el cubrimiento máximo, expresado por unidad de área geométrica, era diferente.

La Figura 1 muestra todos los resultados, expresados como densidad superficial de bacterias (C V / A) en número bacterias adheridas (UFC) por área en μm², en función de la concentración bacteriana residual, C [(UFC/mL)_{res}].

Los factores de porosidad y/o rugosidad usados para corregir cada sustrato se muestran en la Tabla I; se usó como referencia el valor 1 para la secklerita. El valor de la constante de afinidad de Langmuir K_L para el proceso (1) está dado por la ecuación (2):

$$\text{HAP(s)} + \text{bacteria} = \text{HAP-bacteria} \quad (1)$$

$$K_L = \{\text{HAP-bacteria}\} / \{\text{HAP}\} [\text{bacteria}] \quad (2)$$

En la ecuación (2), las llaves representan el número de sitios por unidad de superficie; el número total de sitios disponible para fijar bacterias es

$$\{\text{HAP-bacteria}\}_{\text{max}} = \{\text{HAP-bacteria}\} + \{\text{HAP}\} \quad (3)$$

La Figura 1 muestra la curva correspondiente a la ecuación (2), con $\{\text{HAP-bacteria}\}_{\text{max}} = 6,0$ UFC/μm² y K_L = 2,50×10⁻⁹ mL/UFC. El ajuste es altamente satisfactorio, aunque debe recalarse que, en el caso de algunos de los sustratos empleados, el número de datos experimentales no alcanza para demostrar el comportamiento de Langmuir. Es posible construir un gráfico lineal doble recíproco de $\{\text{HAP-bacteria}\}^{-1}$ en función de $[\text{bacteria}]^{-1}$, con resultados análogos, pero no idénticos, en virtud del diferente peso atribuido a cada punto en cada caso.

Hemos optado por preferir los resultados del ajuste no lineal.

El valor de cubrimiento máximo y el tamaño del *S. mutans* sugieren que el factor de rugosidad de la secklerita debe ser cercano a 10, y por lo tanto las rugosidades de todas las demás unas diez veces mayores que las indicadas en la Tabla I. Puede advertirse que las rugosidades de las diferentes muestras no difieren apreciablemente entre sí, tal vez con la salvedad de la rarita deficiente en calcio, funcionalizada con citrato. Incluso en este caso, el cálculo se realizó sobre la base de un solo valor experimental, por lo que está sujeto a verificación. Puede concluirse que las grandes dimensiones de las bacterias hacen que las mismas detecten a todas las superficies como análogamente rugosas, ignorando los detalles topológicos de dimensiones menores. Tampoco parece importante la densidad de sitios químicos existentes en cada material, ya que los mismos son apreciablemente diferentes en las seis series de raritas, y a pesar de ello no se detectan diferencias muy grandes en la densidad de cubrimiento.

Esta última observación está de acuerdo con la constancia de la constante de afinidad (valga la redundancia): debe visualizarse a la interacción de la superficie con la bacteria como un fenómeno que involucra varios (incluso muchos) sitios superficiales, y todos los materiales disponen de sitios en cantidad adecuada como para no limitar la afinidad.

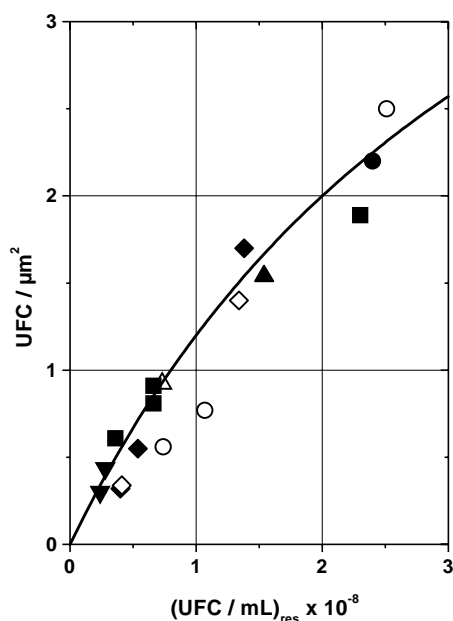


Figura 1. Número de bacterias adheridas por unidad de área versus la concentración residual bacteriana (■, S; ●, Rnf; ◆, RfAc; ▲, RfCit; ○, RdefCa; ◇, RdefCafAc; △, RdefCafCit; ▼, G).

Todas las mediciones se hicieron previo contacto de las pastillas con solución oral, de pH 7,0, que contiene solutos capaces de neutralizar la carga de las partículas de hidroxiapatita. La Figura 2 compara la dependencia con el pH de las movilizadas electroforéticas de la secklerita y de la rarita, en KNO_3 10^{-2} mol dm^{-3} y en la solución oral. La neutralización de las cargas superficiales, producida por los componentes de la solución oral, es muy obvia. El componente electrostático de la afinidad es por lo tanto despreciable, y la adhesión bacteriana responde a interacciones bioquímicas específicas. La afinidad por la HAP de glucosiltransferasas, producidas por *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus casei*, ha sido bien caracterizada en la literatura^[11].

Cuando la concentración del inóculo supera el valor de 3 UFC/mL, comienzan a manifestarse fenómenos cooperativos, que resultan en un aumento aparente de la afinidad con la concentración. Estos fenómenos pueden describirse mediante la ecuación de Hill (4)^[12].

$$\frac{\{\text{HAP-bacteria}\}}{\{\{\text{HAP-bacteria}\}_{\max} - \{\text{HAP-bacteria}\}} = K_L [\text{bacteria}]^n \quad (4)$$

Sin embargo, esta ecuación no es adecuada para describir el fuerte aumento del cubrimiento máximo, muy por arriba del derivado de la región de comportamiento de Langmuir, que se puede observar en la Figura 3. El exponente n es una medida del fenómeno de cooperación en la adhesión: valores de n mayores que 1 indican que la afinidad de la superficie del sustrato aumenta en sitios adyacentes a los sitios cubiertos. El índice de Hill n está vinculado con los potenciales de interacción laterales adsorbato-adsorbato^[13]. En nuestro caso, el aumento de afinidad se debe a interacciones celulares directas, que no requieren de la superficie del sustrato para soportarlas; en otras palabras, las interacciones bacteria-bacteria dan lugar a la formación de multicapas. En esencia, este caso corresponde a una situación límite de la ecuación de Hill, correspondiente a $\{\{\text{HAP-bacteria}\}_{\max} - \{\text{HAP-bacteria}\}\} \rightarrow \{\text{HAP-bacteria}\}_{\max}$. En estas condiciones, si K_L' es una constante empírica, se puede escribir:

$$\{\text{HAP-bacteria}\} = K_L' [\text{bacteria}]^n \quad (5)$$

El comportamiento de HAP a elevadas concentraciones bacterianas fue medido con las raritas deficientes en calcio y, en menor medida, con las

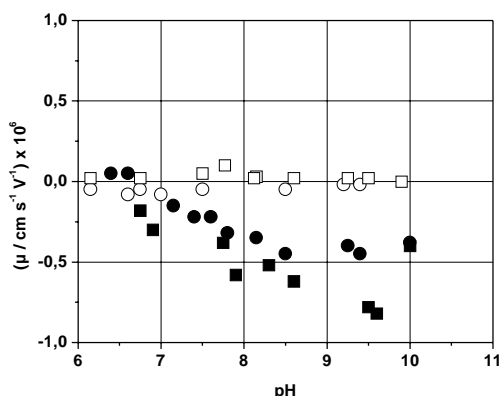


Figura 2. Dependencia con el pH de las movilidades electroforéticas de S y Rnf: en solución acuosa, $I = 0,01 \text{ mol dm}^{-3} (\text{KNO}_3)$ (■ y ●, respectivamente) y en solución oral sintética (□ y ○, respectivamente).

raritas. La Figura 3 muestra el ajuste logrado sobre la base de suponer $n = 3$, un valor relativamente típico para estos sistemas. Los valores de las constantes aparentes empleadas fueron $0,15 \times 10^{-24}$ y $7 \times 10^{-27} \text{ mL}^3 / (\text{UFC})^2 \mu\text{m}^2$, para la rarita y para la rarita deficiente en calcio, respectivamente. Estos valores numéricos no tienen significado físico importante. Las diferencias observadas en los valores de concentración de inóculo a la cual se produce el disparo de la adsorción multicapa merecen un estudio más detallado de la posible influencia del sustrato sobre este fenómeno.

Conclusiones

Todas las muestras estudiadas tienen un comportamiento análogo frente al *S. mutans*, con pequeñas diferencias vinculadas con la rugosidad superficial (macroporos); la única posible excepción la provee la rarita deficiente en calcio, funcionalizada con citrato. En este caso, es necesario realizar más mediciones. La falta de influencia de la microestructura, y de la naturaleza y densidad de los grupos químicos de la HAP indica que el tamaño de las bacterias domina el modo de interacción con la superficie, especialmente en condiciones en las que la carga superficial está neutralizada por la adsorción desde el medio de los diversos iones presentes. Se concluye que no debe esperarse grandes diferencias de comportamiento, en lo que a adhesión de *S. mutans* se refiere, en función de las características de la síntesis de la HAP; es más bien la composición del medio acuoso la que determinará las características de la adhesión. Este hecho concuerda con la conocida tendencia

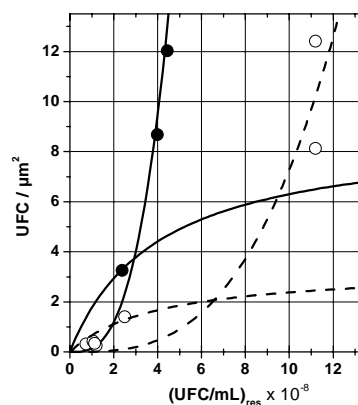


Figura 3. Contribución del modo de Lagmuir y del modo de Hill ($n = 3$) a la adsorción de las raritas no funcionalizadas (●) y de las raritas deficientes en calcio (○).

de las superficies de las sales insolubles de calcio de adquirir una composición determinada por la composición del medio acuoso y no por la estructura del sustrato^[14]. Es posible que la derivatización con polímeros pueda en cambio producir un importante efecto sobre las etapas tempranas de colonización bacteriana.

Cuando la concentración del inóculo de *S. mutans* es elevada, se ponen en juego interacciones bacteria-bacteria, que permiten formar multicapas sobre la HAP, en un comportamiento descrito por una ecuación modificada de Hill, con $n = 3$. De esta manera, la colonización del biomaterial puede variar fuertemente de un individuo sano, con niveles bacterianos normales, a un individuo con un proceso infeccioso. El aumento de *S. mutans* en contacto con el implante, que se dispara a partir de un determinado nivel bacteriano, puede depender de las propiedades del sustrato, por lo que debe ser estudiado en detalle en el futuro.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por CONICET, UNT, ANPCYT y CNEA (Argentina) y por el Proyecto Iberoamericano VIII.6 del CYTED. MAB y MCA son miembros de CONICET. L. García Rodenas midió las movilidades electroforéticas.

Bibliografía

1. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL y Nealey PF. Effects of Synthetic Micro- and Nano-Structured Surfaces on Cell Behavior. *Biomaterials*. 1999; 20:573-588.

2. **Loesche WJ.** Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol. Rev.* 1986; 50: 353-298.
3. **Cai S, Simionato MR, Mayer MP, Novo NF y Zelante F.** Effects of Subinhibitory Concentrations of Chemical Agents on Hydrophobicity and *in vitro* Adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Caries Res.* 1994; 28: 335-341.
4. **Bleiweis AS, Oyston PC, Brady IJ.** Molecular, Immunological and Functional Characterization of the Major Surface Adhesin of *Streptococcus mutans*, en: Genetically Engineered Vaccines, Ciardi JE y col. (eds.), Plenum Pres, New York, (1992) págs. 229-241.
5. **Lamberts BL, Pederson ED, Simonson LG.** The Effects of Basic and Acidic Synthetic Polypeptides on the Adherence of the Oral Bacteria *Streptococcus mutans* and *S. sanguis* to Hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* 1985; 30: 295-298.
6. **Legracie FB, Seckler MM, Derenzo S, Danese M.** Produção de Hidroxiapatita Cristalina por Precipitação. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, Maringa, Brasil, 1995*, págs. 855-862.
7. **López-Macipe A, Rodríguez Clemente R.; Hidalgo-López A, Arita I; García-Garduño MV, Rivera E y Castaño VM.** Wet Chemical Synthesis of Hydroxyapatite Particles from Nonstoichiometric Solutions. *J. Mater. Synt. Proces.* 1998; 6: 21-26.
8. **González Santos R y Guerra López García J.** Materiales Bioactivos para implantes óseos. Características y Aplicaciones, CENIC, La Habana, Cuba (1993), págs. 1-52.
9. **Raibaud P, Caulet M, Galpin J y Mocquot G.** Studies on the Bacterial Flora of the Tract Alimentary of Pigs. II. *Streptococci*; Selective Enumeration and Differentiation of the Dominant Groups. *Appl. Bacteriol.* 1961; 24: 285-291.
10. **Sano H, Matsukubo T, Shibasaki K, Itoi H y Takaesu Y.** Inhibition of Adsorption of Oral *Streptococci* to Saliva Treated Hydroxyapatite by Chitin Derivatives. *Bull. Tokio Dent. Coll.* 1991; 32: 9-17.
11. **Vacca-Smith AM y Bowen WH.** Binding Properties of Streptococcal Glucosyltransferases for Hydroxyapatite, Saliva-coated Hydroxyapatite, and Bacterial Surfaces. *Arch. Oral Biol.* 1998; 43: 103-109.
12. **Ofek I y Doyle RJ.** *Bacterial Adhesion to Cell and Tissues*, Chapman & Hall, New York (1994), págs. 16-40.
13. **Tinoco I, Sauer K y Wang JC,** *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Sciences*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, USA (1985), págs. 559-626.
14. **Cicerone D, Regazzoni AE y Blesa MA.** Electrokinetic Properties of the Calcite/Water Interface in the Presence of Magnesium and Organic Mater. *J. Colloid Interface Sci.* 1992; 154: 423-433.