

INCIDENCIA Y CUANTIFICACION DE MICOPLASMAS EN SALIVA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL Y EN SUJETOS CON ENCIAS SANA

Rosandra Mazzali de Ilja (*)

RESUMEN

Es ampliamente conocido que el nicho ecológico de los micoplasmas bucales lo constituye tanto el saco gingival en los pacientes con periodontitis (PP), como el surco gingival en los sujetos con encía sana (ES), diseminándose de allí a la saliva, y por ende a toda la cavidad bucal.

Los objetivos de este trabajo fueron: detectar la incidencia y cuantificar la concentración de micoplasmas en 30 PP y en 50 sujetos con ES, para comprobar si hay diferencia entre ellos -En segundo lugar evaluar "in vitro", la supervivencia de *M. salivarium* ante diferentes agentes, tanto físicos (temperaturas de 4, 22, 37 y 40°C), como químicos (sustancias empleadas como antisépticos en la higiene de la boca).

Para la primera parte se tomaron muestras de saliva, tanto con capilares como con hisopos de algodón, en ambos grupos. Con las mismas se determinó tanto la incidencia como la cuantificación de las colonias de micoplasmas aislados, siguiendo

técnicas recomendadas por el C.D.C. de Atlanta. Las curvas de supervivencia de *M. salivarium* se realizaron tomando muestras de la mencionada cepa cultivada en medio líquido, a intervalos de 48 horas, desde el día cero hasta el 40º, cuantificando posteriormente la concentración del microorganismo en cada una de ellas.

Para las pruebas con agentes químicos se impregnaron discos de 8 mm de diámetro, con los diferentes antisépticos, colocándolos sobre cultivos semiconfluentes de *M. salivarium* en agar.

Los resultados demostraron un porcentaje de positividad para micoplasmas del 80% en los PP y del 50% en los de ES, siendo las concentraciones del 5.0×10^3 a 8.0×10^6 para los primeros y de 3.0×10^2 a 4.5×10^4 en el segundo grupo ($P < 0.001$).

En relación a las pruebas de supervivencia, comprobamos que *M. salivarium* se mantuvo hasta 32-34 días a temperaturas de 4, 22 y 37°C, mientras que a 40°C se inactivó a partir del 8º día. En cuanto a los agentes químicos, ninguno demostró ser capaz de inhibir el crecimiento de la citada cepa.

(*) Bioanalista-Microbiólogo, Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela (UCV).

Este trabajo se hizo acreedor al Premio: Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1990.

Conclusiones: tanto la incidencia, como la concentración de micoplasmas, fueron mayores entre los casos con EP, en relación a los sujetos con ES.

Sólo temperaturas iguales o superiores a 40°C con capaces de frenar el desarrollo de *M. salivarium*, en cambio ninguno de los antisépticos evaluados, tuvo acción contra dicha cepa, pese a tratarse de microorganismos carentes de pared celular. Todo ello explica, en parte, el por qué de la persistencia de dicha especie como colonizador crónico de la cavidad bucal, en un alto porcentaje de la población.

OBJETIVOS

1. Determinar la incidencia de micoplasmas en la saliva de pacientes con enfermedad periodontal y en sujetos con encía sana, para establecer relación entre los dos grupos.
2. Evaluar 2 métodos para la toma de las muestras de saliva: tubo capilar tipo microhematocrito hisopo de algodón.
3. Cuantificar la presencia de micoplasmas en cada grupo, con el fin de comprobar si hay diferencias significativas.
4. Determinar la supervivencia de una cepa de *Mycoplasma salivarium*, aislada de un paciente con periodontitis, ante diferentes agentes, tanto físicos (diferentes temperaturas de incubación), como químicos (antisépticos más comúnmente empleados en la higiene de la cavidad bucal). Todo ello con el fin de determinar el por qué de la cronicidad de la colonización de dichos microorganismos.

INTRODUCCION

"La enfermedad periodontal es una de las afecciones más difundidas de la humanidad. No hay nación ni región del mundo que se vea libre de ella, y en su mayor parte tiene una alta frecuencia, afectando aproximadamente a la mitad de la población infantil, y a casi toda la población adulta".

World Health Organization: Technical Report Series

Nº 207, página 3, 1961.

La enfermedad periodontal constituye en la actualidad un grave problema de salud pública en todo el mundo. Las estadísticas varían entre las

diversas poblaciones, pero es consenso general que dicha afección es la principal causa de la pérdida de dientes en la población adulta mayor de 35 años de edad. Sin embargo no es una enfermedad exclusiva del adulto, ya que comienza mucho antes de que sea necesaria la extracción dentaria; ya a los 15 años 4 de cada 5 personas tienen gingivitis, y en aproximadamente el 4% hay periodontitis. No todas las gingivitis de edades tempranas evolucionan hacia enfermedad periodontal, pero con muy pocas excepciones, la periodontitis que destruye la dentadura de los adultos, comienza con una gingivitis (Carranza 1984).

Etiología de la enfermedad periodontal:

En la etiología de la enfermedad gingival y periodontal intervienen tanto factores locales como generales. Los primeros son los que provienen del medio que rodea el periodonto, mientras que los generales se originan en el estado del paciente. Los factores locales inducen inflamación, que es el proceso patológico principal de la periodontitis, mientras que los factores generales condicionan la respuesta periodontal a los locales, de tal manera que con frecuencia el efecto de los irritantes locales (bacterias y sus productos) es agravado por el estado general del paciente (mecanismos inmunológicos).

Los microorganismos juegan un papel muy importante en la etiología de la enfermedad periodontal, como factores desencadenantes, perpetuantes o complicantes. Está ampliamente demostrado que la localización selectiva de las bacterias en diferentes sitios anatómicos de la cavidad bucal, depende de su capacidad de adherirse a determinada superficie, lográndolo por varios mecanismos: mediante agregación salival, gracias al principio electrostático, por síntesis de polímeros extracelulares, por presencia de fimbrias o por simple adherencia física (Sabelli 1985).

Evidencias aportadas en la última década indican que las principales vías de entrada de las bacterias al tejido periodontal son: a través del epitelio de unión, del surco y/o saco gingival. En el cuadro Nº 1 están resumidos la mayor parte de los mecanismos de interacción entre los microorganismos y el hospedero en la enfermedad periodontal.

Criterios que determinan cuándo un microorganismo es periodontopatógeno:

Si bien el criterio clásico de reconocer la etiología bacteriana de un determinado proceso infeccioso humano, debe seguir los postulados de Koch, éstos no pueden ser aplicados en su totalidad en el estudio de la enfermedad periodontal, pues las infecciones bucales están asociadas a una interrelación compleja de factores. Por ello Socranski en 1977 sugirió como alternativa a los postulados de Koch, 5 criterios que reflejan el actual conocimiento de la relación de determinado agente, con la enfermedad periodontal:

1. El número de microorganismos incriminados, debe estar incrementado en el sitio patológico, e inversamente, debe reducirse o eliminarse en los sitios sanos.
2. Si el agente etiológico es suprimido, la enfermedad debe detenerse.
3. La respuesta del hospedero puede suministrar una guía importante ante el papel de ciertos microorganismos en determinada enfermedad. Un incremento o disminución de respuesta celular y/o la mediada por anticuerpos, ante cierta especie, en la enfermedad periodontal, sugiere un papel de esa bacteria en el proceso infeccioso.
4. Demostración del poder patógeno de ciertas bacterias incriminadas en la citada enfermedad, en animales de experimentación.
5. Virulencia bacteriana.

Se calculan entre 300 y 400 las especies microbianas que pueden recuperarse de la placa dental, entre microorganismos cultivables y no cultivables, correspondientes a los siguientes géneros: *Actinobacillus*, *Bacteroides*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Bacterionema*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Eikenella*, *Haemophilus*, *Micrococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Vibrio*, *Selenomonas*, *Rothia*, *Arachnia*, *Acidaminococcus*, *Peptococcus*, *Brahnamella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Wolinella*, *Mycoplasma*, *Candida*, *Trichomonas*, *Entamoeba*, etc.

De todos ellos los más incriminados actualmente como causantes de enfermedad periodontal son los siete primeros géneros, aunque todos los demás de una u otra forma cooperan en el proceso inflamatorio que acompaña dicha afección. Sin embargo en la última década, gracias a numerosos estudios, han aparecido claras evidencias que incluyen al género *Mycoplasma*, en particular la especie *M. salivarium*, como miembros de la flora periodontopatógena.

Los micoplasmas son considerados como habitantes normales de la cavidad bucal, formando parte de su microbiota. Las especies de la familia *Mycoplasmataceae* que pueden hallarse en dicho sitio anatómico son: *M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*, *M. faucium*, y eventualmente *Ureaplasma urealyticum* y *M. hominis*, siendo las dos primeras las más frecuentes.

El primer aislamiento de micoplasmas en cavidad bucal, a partir de muestras de saliva, fue realizado hace 4 décadas (Morton 1951); posteriores estudios demostraron la amplia distribución de dichos microorganismos en diferentes nichos de la boca y en diversas patologías (Burnet 1959, Barile 1960, Shklair 1962, Razin 1964, Serene 1967, Engel 1970, Kumagai 1971 y Watanabe 1967, 1972). *M. salivarium* ha sido aislado con más frecuencia del saco gingival de pacientes con enfermedad periodontal que en sujetos con encía sana (Engel 1970, Kumagai 1971, Watanabe 1972, 1986, Perrone 1987), siendo además la especie de micoplasma predominante en placa dental (Kumagai 1971, Uchida 1981, Perrone 1987). Las principales evidencias que apoyan la correlación entre la presencia de *M. salivarium* a elevadas concentraciones y periodontitis, son:

- a. Elevados títulos de anticuerpos contra dicha especie en pacientes con la mencionada enfermedad (Kumagai 1971, Watanabe 1986), así como anticuerpos IgM producidos contra la IgG en animales de experimentación (Watanabe 1987).
- b. La liberación de histamina al producirse el contacto entre el microorganismo y los leucocitos (Parkinson 1975a)
- c. La fagocitosis de micoplasmas por parte de los leucocitos, como consecuencia de la liberación de enzimas lisosomales (Parkinson 1975b).

C U A D R O N º 1
INTERACCION MICROORGANISMOS-HOSPEDERO
EN LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

MICROORGANISMOS	Cocos Gram + Actinomyces sp. bacterias Gram-	Bacteroides sp. Fusobacterium sp. Selenomonas sp. Mycoplasma Treponema	Bacteroides de pigmentación negra	Actinobacillus actinomycetencoMitans Capnocytophaga
MECANISMOS DE ACCION	Componentes moleculares, enzimas, endotoxinas.	Comp. molecul. Factores inhibitorios de quimiotaxis; actividad fibrinolítica) Enzimas (colagenasa, tripsina, fosfolipasa). Sustancias tóxicas: endotoxinas factor citotóxico.	cápsula, polisacáridos, enzimas : colagenasa, tripsina, fibrinolisina, hialuronidasa, heparina, ribo y desoxiribonucleasa. indol, amoniaco, hidrógeno sulfurado metilmercaptano ácidos grasos	Comp. moleculares enzimas sustancias tóxicas: endotoxinas leucotoxinas
RESPUESTA HOSPEDERO	activación del complemento, quimiotaxis; PMN-macrófagos Inflamación alergia tipo I	PMN-macrófagos muerte de los PMN linfocitos B linfocitos T complemento	Lesiones de tejidos blandos reabsorción de tejido óseo	Enzimas lisosomales alergia tipos I, II y III alergia tipo IV
	ENFERMEDAD GINGIVITIS	PERIODONTITIS	PERIODONTITIS	PERIODONTITIS PERIODONTITIS JUVENIL LOCALIZADA

Modificado de Slots 1982 y Sabelli 1985.

d. La inducción experimental de hipersensibilidad retardada por parte de *M. salivarium* en conejos (Matsuura 1978).

Además se ha comprobado el efecto micoplasmicida de extractos de polimorfonucleares in vitro (Dajani 1969), así como la inducción de citotoxicidad en linfocitos normales de ratón, mediada por la presencia de una especie de ratón: *M. arthritidis* (Cole 1980).

e. Estudios por microscopia electrónica han demostrado presencia de micoplasmas en el epitelio oral del saco gingival de pacientes con periodontitis (Carranza 1983, Jung 1981, Newman 1984, Saglie 1985), así como en eritrocitos (Razin 1980).

f. Además dichos microorganismos poseen una gran variedad de mecanismos bioquímicos, tales como: lipólisis, proteólisis, hemólisis, hemadsorción, hemaglutinación, hidrólisis de arginina se-

guida por eliminación de altas concentraciones de amoníaco, actividades estas que facilitan su adherencia y la de otros patógenos a la célula hospedadora, causando diversos tipos de alteraciones en la misma.

Varias investigaciones reportan la presencia de *M. salivarium* como agente causante de gingivitis y periodontitis (Kumagai 1971, Freedman 1968, Watanabe 1972), así como en encía crónicamente inflamada (Freedman 1968), en periodontitis crónica (Saglie 1982a). También se observó en muestras de placa dental en pacientes con síndrome de Papillón-Lefevre (Jung 1981) no habiéndose encontrado en cambio en pacientes edentulos (Razin 1964), o en concentraciones muy escasas (Watanabe 1971).

Se postula que la presencia de micoplasmas bucales en elevadas concentraciones depende de varios factores presentes en el surco y/o saco gingival, tales como: condiciones microaerofilicas, factores nutricionales presentes en los detritus celulares y/o a una relación simbiótica con el resto de la microbiota del área.

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Pacientes:

Se escogieron 80 individuos que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, para tratamientos diversos, dividiéndose en 2 grupos de acuerdo al aspecto de su encía:

a. 50 mostraron encía sana, con una profundidad de surco gingival igual o menor a 3 mm. La edad de dicho grupo, que se tomó como control, estuvo comprendida entre 15 y 50 años, con una media de 32; 27 del sexo femenino y 23 del masculino.

b. 20 pacientes con enfermedad periodontal, con una profundidad de saco gingival mayor de 3 mm. Dentro de este grupo se incluyeron: 5 con periodontitis juvenil, 1 con síndrome de Papillón-Lefevre y 24 con periodontitis del adulto. Las edades estuvieron comprendidas entre 12 y 53 años, con una media de 30; 18 del sexo femenino y 12 del masculino.

Los criterios para la evaluación del estado de la encía de todos estos sujetos fueron los empleados por la Cátedra de Periodoncia de esta Facultad,

realizándose la toma de las muestras bajo la supervisión de profesores y/o estudiantes de postgrado en dicha especialidad.

Toma de las muestras de saliva:

Se hizo de 2 maneras:

a. Aspirando la muestra con tubos capilares de 80 x 1 mm, del tipo empleado para microhematocrito en laboratorio clínico, pero sin heparina, colocado en la región lingual de los molares inferiores.

b. Impregnando un hisopo de algodón, estéril, con saliva y frotando simultáneamente la encía de los molares, en la misma región previamente citada. Cada muestra fue colocada en tubos que contenían 2 ml de caldo PPLO con 1000 UI/ml de penicilina, enviándose inmediatamente al laboratorio.

Siembra de las muestras:

Las muestras fueron procesadas de inmediato al llegar al laboratorio; en ambos casos se mezclaron bien con la ayuda de un vortex, para la elución del material, luego se retiró tanto el tubo de hematocrito como el hisopo, de los respectivos tubos, procediéndose a su siembra. La misma se realizó tanto en medio líquido (caldo PPLO con arginina, suplementado con suero de caballo y extracto de levadura) como en medio sólido (agar suplementado, similar al caldo), a razón de 0,1 ml por placa de Petri de 60 mm de diámetro y de 0,4 ml por vial con 3,6 ml de medio líquido. La siembra en placas se hizo por duplicado y empleando 2 diluciones de factor 10 (1:10 y 1:100, además del puro); la incubación de las mismas se llevó a cabo en condiciones anaeróbicas, empleando el sistema Gas Pak de BBL, por períodos de 72 a 96 horas. Las fórmulas de los medios empleados para el aislamiento de micoplasmas, fueron las recomendadas por el Center for Diseases Control de Atlanta (Velleca 1980).

Cuantificación de micoplasmas:

La cuantificación se realizó contando el número de colonias de micoplasmas observado en las diluciones de los cultivos en agar, con ayuda de un microscopio estereoscópico con aumento total de 100X, calculando las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Aislamiento de la cepa de M. salivarium OD-87:

El aislamiento se realizó a partir de la saliva de un paciente con periodontitis, sembrada en agar, clonada, cultivada en caldo e identificada por el método de inhibición del crecimiento con el antisuero homólogo.

Identificación de la cepa de M. salivarium OD-87:

La identificación de la mencionada cepa se llevó a cabo por 2 procedimientos: por inhibición del crecimiento con el antisuero específico (Clyde 1964) y por microscopia electrónica de transmisión.

Para el primer método se sembró una placa de Petri con el medio arriba señalado, con una concentración de micoplasmas de 1.0×10^4 /ml, colocándose en forma equidistante, los 5 discos impregnados con los respectivos antisueros de cepas bucales: *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. orale*, *M. faucium*, *M. buccale*, suministrados por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland (tramitados por la OPS de Caracas). Se incubó en anaerobiosis por 3 días.

Microscopia electrónica de transmisión:

Para ello se concentraron 500 ml de cultivo de la cepa *M. salivarium* OD-87 en caldo con arginina, por centrifugación a 40.000 rpm por 1 hora, resuspendiéndose el sedimento en un volumen de 0,5 ml de solución salina fosfatada pH 7.2 (concentración 100X). Posteriormente se fijó con una solución de glutaraldehído al 2% en el mismo tampón, durante 2 horas, igual tiempo se aplicó ácido ósmico al 1%. Luego se procedió a la deshidratación del material en diferentes concentraciones de alcohol etílico, desde 50% hasta 100%, se incluyó en Epon, dejándose polimerizar por 48 horas a 60°C. Los cortes se realizaron con microtomo Poster-Blum MT-28, tiñéndose con acetato de uranio y citrato de plomo; la observación se hizo en microscopio electrónico Hitachi H-500.

Curvas de supervivencia de la cepa de M. salivarium OD-87 a diferentes temperaturas:

Se realizaron mediante tomas de cultivos en medio líquido de la referida cepa, incubados respectivamente a 0, 22, 37 y 40°C, desde el día cero hasta el 40º, a intervalos de 48 horas. Todas las muestras se mantuvieron congeladas a -20°C hasta

concluir el experimento, al cabo de lo cual se sembraron en placas de Petri, determinándose los títulos a las 72 horas de incubación a 37°C (en UFC/ml).

Pruebas de supervivencia con los agentes químicos de la cepa M. salivarium OD-87:

Se evaluaron las siguientes sustancias: 4 enjuagues bucales (Fluorinse, Fluocaril, Oraldine y Listerine), 2 agentes oxidantes (Amosan y agua oxigenada de 10 volúmenes), 3 anti-inflamatorios (Laimoqualin, Tantum y Gencivol) y 3 cremas dentales (Crest, Colgate y Pepsodent). Como controles se emplearon discos de tetraciclina de 30 ug/ml, antimicrobiano altamente efectivo contra *M. salivarium*.

Con todas las sustancias líquidas se impregnaron discos de 8 mm de diámetro, mientras que con las pastosas se hicieron previamente suspensiones al 10% en caldo PPLO; todos estos agentes químicos se emplearon tanto puros como diluidos 1:10. Los discos impregnados se colocaron en forma equidistante en placas de Petri sembradas con la referida cepa a una concentración de 1.0×10^4 /ml UFC, en forma similar a la descrita anteriormente.

RESULTADOS

La incidencia de micoplasmas obtenida para los dos grupos de pacientes evaluados fue la siguiente: 50% (25/50) para los de encía sana (grupo control) y del 80% (24/30) para los de enfermedad periodontal.

En cuanto a la cuantificación de dichos microorganismos (cuadro N° 2) encontramos que en el primer grupo las concentraciones variaron entre 3.0×10^2 y 4.5×10^4 (media: 3.5×10^3) mientras que para el segundo estuvieron entre 5.0×10^3 y 8.0×10^6 (media: 1.0×10^5), con un valor de $P < 0,001$.

Las concentraciones mas elevadas de micoplasmas correspondieron a los casos de periodontitis juvenil y al síndrome de Papillón-Lefèvre (ver cuadro N° 2).

No hubo diferencia significativa entre los conteos realizados con los 2 tipos de muestras (hisopos y capilares de microhematocrito).

La identificación de la cepa de *M. salivarium* OD-87, cuyas colonias típicas con aspecto de "hue-

CUADRO N° 2

CONTAJES DE COLONIAS DE MICOPLASMAS EN LOS DOS GRUPOS DE SUJETOS EVALUADOS EN UFC/ML

Grupo control (N=50)			Grupo con periodontitis (N=30)		
N°	edad	contaje (UFC/ml)	N°	edad	contaje (UFC/ml)
1	29	0	1	51	1.9 x 10 ⁴
2	32	0	2	48	9.0 x 10 ⁵
3	25	1.2 x 10 ²	3	40	4.4 x 10 ⁴
4	20	7.1 x 10 ³	4	35	8.1 x 10 ³
5	41	0	5	16*	5.4 x 10 ⁶
6	47	0	6	18*	7.0 x 10 ⁶
7	15	3.0 x 10 ²	7	53	8.2 x 10 ³
8	42	8.0 x 10 ²	8	29	5.0 x 10 ³
9	40	1.2 x 10 ³	9	18*	3.2 x 10 ⁶
10	35	0	10	38	0
11	28	2.0 x 10 ⁴	10	36	5.0 x 10 ⁴
12	26	5.2 x 10 ²	11	29	8.6 x 10 ⁵
13	20	0	12	31	2.4 x 10 ⁴
14	48	0	14	28	4.5 x 10 ⁴
15	31	1.4 x 10 ³	15	39	0
16	50	4.3 x 10 ⁴	16	45	0
17	28	0	17	30	8.6 x 10 ⁵
18	30	2.5 x 10 ³	18	12**	8.0 x 10 ⁶
19	19	0	19	41	9.0 x 10 ⁵
20	36	1.8 x 10 ²	20	31	0
21	40	0	21	27	5.4 x 10 ⁴
22	43	1.6 x 10 ²	22	25	2.0 x 10 ⁵
23	29	0	23	21	4.8 x 10 ⁴
24	32	0	24	14*	6.8 x 10 ⁶
25	26	4.5 x 10 ⁴	25	16*	1.8 x 10 ⁶
26	39	2.5 x 10 ³	26	28	0
27	19	0	27	31	3.6 x 10 ⁴
28	24	0	28	36	8.8 x 10 ³
29	23	0	29	31	0
30	31	1.1 x 10 ³	30	30	7.8 x 10 ⁵
31	32	0			
32	45	6.0 x 10 ²			
33	49	0			
34	31	0			
35	35	3.5 x 10 ²			
36	39	2.5 x 10 ³			
37	26	1.2 x 10 ⁴			
38	23	8.0 x 10 ²			
39	24	0			
40	31	0			
41	37	0			
42	40	1.6 x 10 ²			
43	43	0			
44	27	7.5 x 10 ²			
45	37	0			
46	45	1.0 x 10 ⁴			
47	28	0			
48	27	2.6 x 10 ³			
49	36	1.4 x 10 ²			
50	31	0			

* Pacientes con periodontitis juvenil

** Pacientes con síndrome de Papillón - Lefévfe

vo frito" observamos en la Foto N° 1, dio un claro halo de inhibición alrededor del disco que contenía el antisuero homólogo.

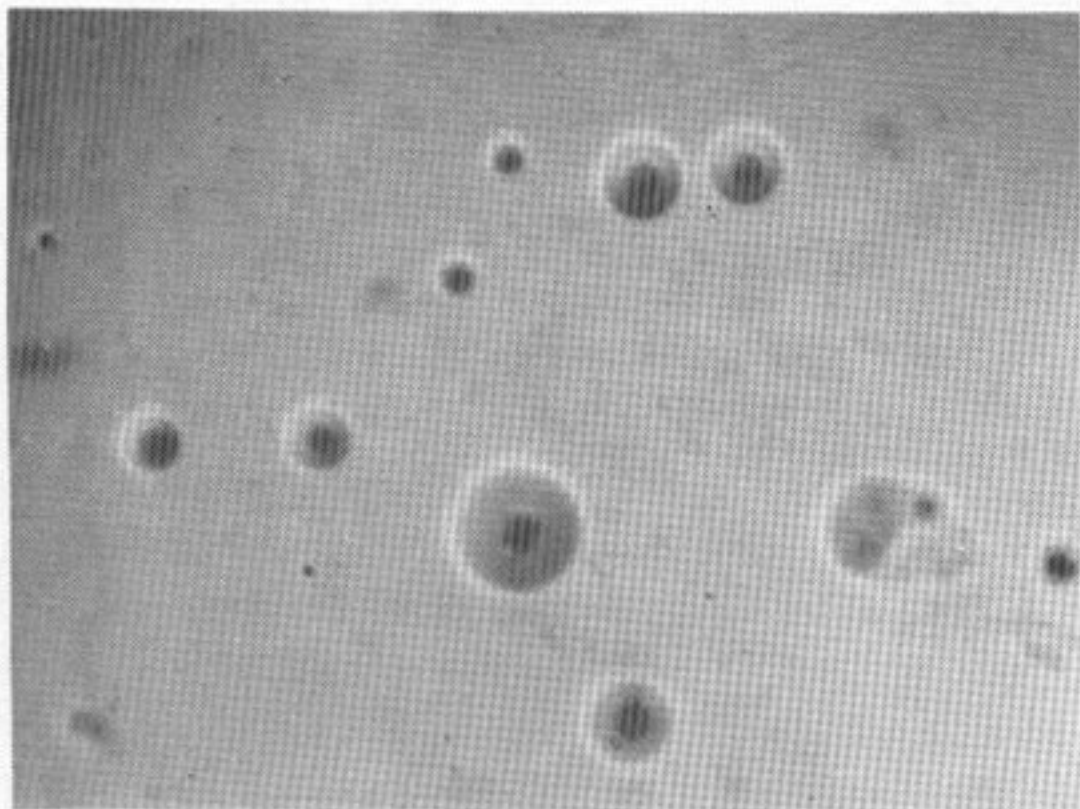


FOTO 1: COLONIAS TÍPICAS DE MYCOPLASMA SALIVARIUM (CEPA OD-87) CON ASPECTO DE "HUEVO FRITO", EN CULTIVO DE 4 DÍAS EN AGAR PPLO SUPLEMENTADO. AUMENTO: 300X.

La microscopía electrónica de transmisión demostró estructuras características del género Mycoplasma, tanto de forma cocoide como alargadas, con su típica membrana plasmática trilaminar y ausencia de pared celular, perfectamente diferenciables de las bacterias (Foto N° 2).

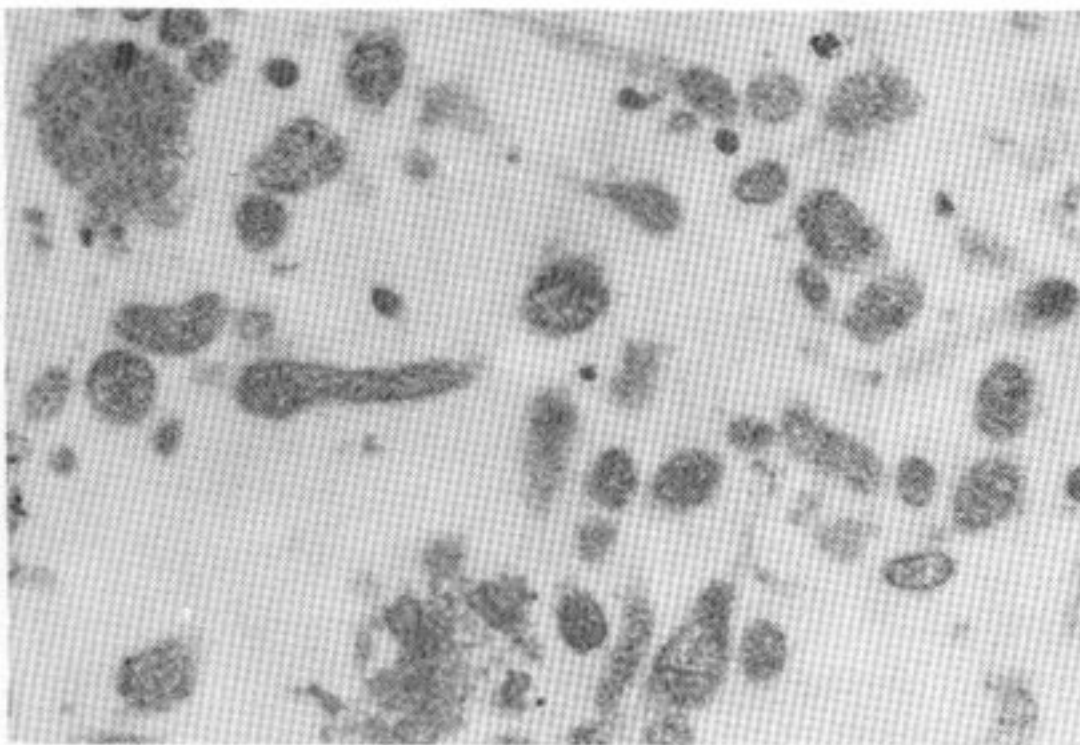
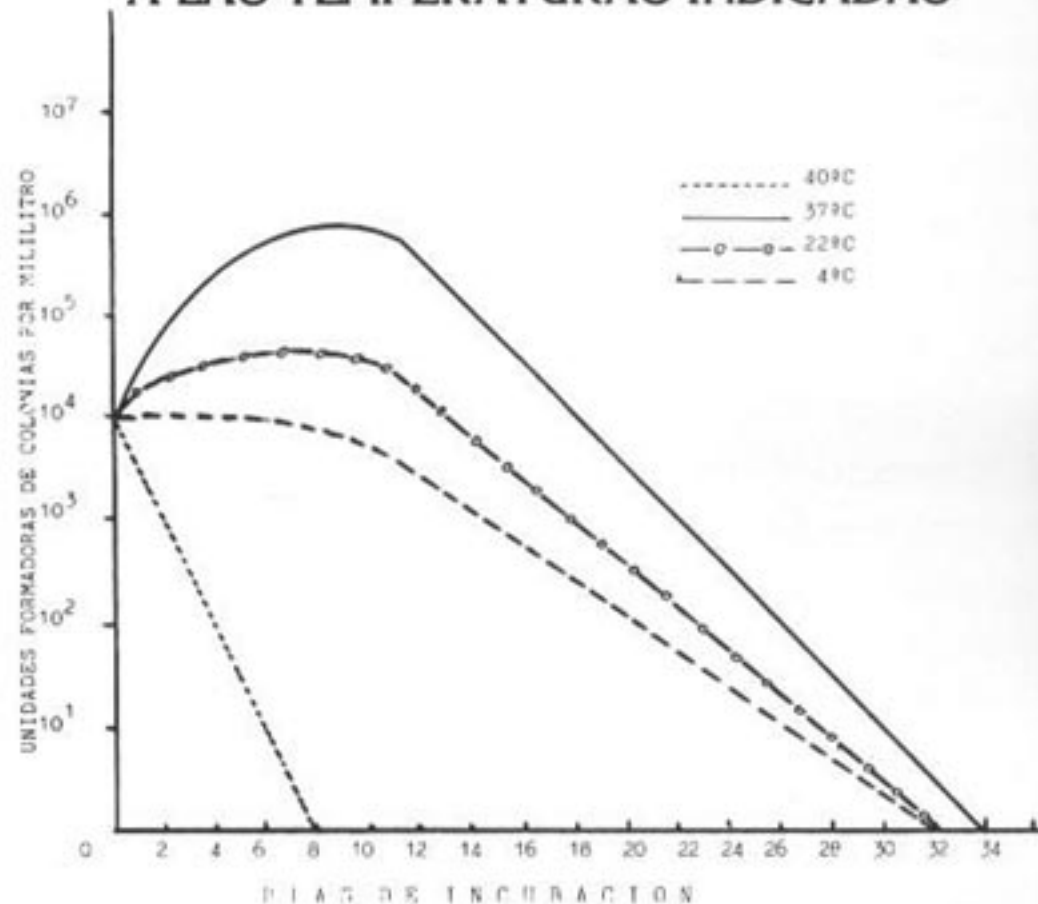


FOTO N° 2: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA CEPA DE M. SALIVARIUM OD-87, MOSTRANDO LAS TÍPICAS ESTRUCTURAS, TANTO COCIDES COMO ALARGADAS, CON SU MEMBRANA TRILAMINAR (AUMENTO: 20.000X).

En relación a las curvas de supervivencia, comprobamos viabilidad de micoplasmas hasta el día 32° a temperaturas de 4 22 y 37°C, mientras que a 40°C solo sobrevivieron hasta el 8° día (Gráfico N° 1).

GRAFICO N° 1
CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LA CEPA DE MYCOPLASMA SALIVARIUM OD-87 A LAS TEMPERATURAS INDICADAS



Finalmente, con ninguno de los agentes antisépticos evaluados se comprobó inhibición del crecimiento de la cepa de M. salivarium OD-87, comprobándose en cambio una amplia zona de inhibición alrededor del disco con tetraciclina que se empleó como control.

DISCUSION

En estudio previo (Perrone 1987) se había demostrado una incidencia de micoplasmas de 18 y 44% en sujetos con encía sana y periodontitis respectivamente, en muestras de hisopados gingivales tomadas de la zona anteroinferior de los incisivos, mientras que en este trabajo encontramos cifras mayores en saliva, con valores de 50 y 80% para cada caso. La diferencia quizás se debió al hecho de que en esta oportunidad el muestreo se realizó en los molares, donde las condiciones anaeróbicas son más estrictas, hallazgo corroborado por estudio previo (Uchida 1981b).

Estudios similares de otros autores reportan rangos de incidencia entre 32 y 82% para sujetos

con encía sana, y entre 57 y 100% en pacientes con enfermedad periodontal (Engel 1970, Kumagai 1971, Watanabe 1972, 1986). En estudios previos habíamos demostrado que la especie aislada con más frecuencia en cavidad bucal era *M. salivarium*, con un 96% (Perrone 1987, Bechara 1990), por lo que en este trabajo nos limitamos a determinar sólo el género *Mycoplasma*, sin identificar la especie.

No obstante consideramos que más importante que la incidencia de micoplasmas en saliva, es su cuantificación, habiéndose realizado muy pocos estudios en este sentido. Sin embargo hallazgos previos reportan resultados similares a los nuestros, pero en diferentes tipos de muestras, con rangos entre 1.09×10^2 y 1.75×10^5 en placa dental (Uchida 1981a), en enjuagues bucales valores entre 1.3×10^2 y 8.0×10^4 en sujetos con encía sana y entre 1.0×10^3 a 8.0×10^6 en periodontitis (Watanabe 1972). Un estudio más reciente señala cifras entre 6.8×10^3 y 4.6×10^6 para enfermedad periodontal y 1.0×10^2 y 6.1×10^4 en sujetos sanos, en muestras de saliva proveniente de toda la cavidad bucal (Watanabe 1986).

Como *M. salivarium* es la especie predominante, tanto en surco gingival como en placa dental (Kumagai 1971), se trata de determinar si juega un papel importante en la afección que nos ocupa. Las reacciones inflamatorias y las respuestas traumáticas, ocasionan migración extravascular de basófilos (polimorfonucleares ricos en histamina) al sitio del daño. Este fenómeno invita a la especulación de que *M. salivarium*, al ser fagocitado por dichos leucocitos, estimula la producción de histamina por parte de los que han migrado al tejido periodontal inflamado, hecho corroborado experimentalmente (Parkinson 1975a, 1975b). Queda así comprobado que los micoplasmas cooperarían a potenciar la producción de histamina por parte de los polimorfonucleares infectados, a la par que el resto de las bacterias reconocidas como periodontopatógenas.

Estudios posteriores, con la ayuda de la microscopía electrónica, demostraron una serie de mecanismos que contribuyeron a explicar algunas de las interacciones bacteria-hospedero, entre ellos cabe mencionar: aglutinación de eritrocitos en el área del saco gingival y de la encía misma, además de fenómenos de hemadsorción, hemaglutinación y hemólisis, reacciones que contribuyen al daño de la célula (Razin 1980, Newman 1984). Además se

comprobó vacuolización en las células epiteliales, tanto de la superficie como del saco gingival (Newman 1984). Esta estrecha asociación o adherencia física entre la membrana de los micoplasmas y la de las células, es un importante paso en la iniciación de la infección, protegiendo en parte al microorganismo de los mecanismos de defensa del hospedero. El metabolismo activo por parte de los micoplasmas adheridos a las células y demostrado por microscopía electrónica, es un requisito para que ocurra el daño tisular. También la motilidad ha sido demostrada en el género *Mycoplasma*, por lo tanto se supone que este pueda ser el mecanismo por el cual esta bacteria penetra los tejidos blandos periodontales, ocasionando deslizamiento de la estructura terminal (Newman 1984).

En casos de periodontitis juvenil se demostraron micoplasmas tanto en los dientes, como en el epitelio del saco gingival e invadiendo el epitelio y el tejido conectivo adyacentes a la encía (Newman 1984). También fueron observados en los espacios intercelulares del epitelio y dentro de algunos leucocitos, tanto en encía como en hueso alveolar (Carranza 1983). En la placa subgingival de un paciente con síndrome de Papillón-Lefèvre, se pudieron evidenciar, tanto por microscopía electrónica de barrido, como en preparaciones histológicas, microcolonias de microorganismos pequeños, rodeadas de espiroquetas, que por su morfología se deduce que pueda tratarse de micoplasmas (Jung 1981); en nuestro estudio la mayor concentración de ellos la obtuvimos precisamente en un paciente con dicho síndrome (Cuadro N° 2).

En exhaustivos estudios bacteriológicos de casos de periodontitis severa se encontraron dichas bacterias en el 43% de muestras provenientes de placa supragingival y en un 55% en placa subgingival, pero a muy bajas concentraciones (Moore 1982b), en cambio se encontró en un sólo caso de gingivitis experimental (Moore 1982a).

Está ampliamente demostrado que las especies de micoplasmas de la cavidad bucal degradan activamente la arginina por la vía enzimática de la deiminasa, ornitina-transcarbamilasa y carbamilfosfoquinasa, eliminando como desecho de esa acción el amoníaco, producto altamente tóxico para las células animales, elevando el pH de la región afectada y originando un ambiente favorable a la formación del cálculo dental, mecanismo estre-

chamente relacionado al origen de la enfermedad periodontal (Watanabe 1972). Además se ha podido demostrar presencia de actividad lipolítica en varias cepas de *M. salivarium*, teniendo también dicha enzima un efecto dañino sobre la membrana de las células (Watanabe 1972).

Los micoplasmas son cultivados normalmente en medios que contienen sueros animales, teniendo la propiedad, como ya se mencionó, de adherir diferentes sustancias a su membrana celular. Si llevamos esta situación al caso de *M. salivarium* multiplicándose en el surco gingival, su presencia pudiera estimular la producción de autoanticuerpos, no solamente contra componentes del suero sino además contra restos celulares de tejido periodontal destruido. Estudios recientes han demostrado que dicha especie, propagada en medio que contiene suero de conejo y luego inoculada en dicho animal, induce formación de autoanticuerpos IgM contra las IgG del mismo (Watanabe 1987). *M. salivarium* es un miembro de la microbiota propia del surco gingival, por lo tanto si se propaga en ese hábitat, su superficie quedará adherida con componentes, tanto del suero como de restos celulares del tejido del hospedador. Dichas sustancias serán reconocidas como extrañas desde el punto de vista inmunológico, por parte del hospedero, estimulando la producción de autoanticuerpos, mecanismo que será coadyuvado por la presencia de la placa dental y de algunos componentes celulares de las bacterias bucales, tales como lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Se considera por lo tanto que este mecanismo juega un papel muy importante en la destrucción de los tejidos periodontales.

En relación a la supervivencia de los micoplasmas ante factores adversos, tanto físicos como químicos es un hallazgo del cual ya teníamos ciertas evidencias. Estudios previos realizados con micoplasmas contaminantes crónicos de cultivos celulares, nos habían demostrado una notable resistencia de dichos microorganismos, hecho que corroboramos en este estudio, aunque en condiciones diferentes (Mazzali 1971, Mazzali de Ilja 1978, 1989). Ello probablemente sea debido a su estrecho contacto con las células epiteliales, a las cuales se adhieren firmemente mediante receptores específicos. Además se sabe que cuando las condiciones del medio le son adversas, pueden entrar a través de la membrana de la células hospedadora por pinoci-

tosis, alojándose en vacuolas, de donde salen nuevamente al exterior cuando las condiciones vuelven a serle favorables (Mazzali 1971).

A pesar de todas las evidencias, tanto cuantitativas, como ultraestructurales e inmunológicas, de la importancia de la presencia de micoplasmas en la enfermedad periodontal, consideramos que se requiere ahondar un poco más en el estudio del papel de estas bacterias en dicha patología.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó que más importante que la incidencia de micoplasmas en saliva de pacientes con enfermedad periodontal, en relación con los sujetos sanos, es su concentración, lo que demuestra una estrecha asociación entre dicho microorganismo y la mencionada afección. Obviamente, recordando que se trata de una enfermedad con etiología multifactorial, donde los micoplasmas representan tan solo un Género dentro del amplio universo de la microbiota periodontopatogena.
2. Sólo temperaturas iguales o superiores a 40°C son capaces de inhibir el crecimiento de *M. salivarium*, en cambio ninguna de las sustancias antisépticas evaluadas tuvo acción contra la mencionada cepa, hecho que nos sorprende por tratarse de microorganismos que carecen de pared celular, generalmente muy lábiles ante diversos agente tanto físicos como químicos.

Estos dos hechos nos permiten explicar en parte que, pese a las condiciones adversas presentes en la cavidad bucal (cambios de temperaturas frecuentes durante la ingestión de alimentos) y la aplicación de sustancias antisépticas de diversa índole, los micoplasmas permanecen como colonizadores crónicos de la boca en un alto porcentaje de la población evaluada.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi más sinceras palabras de reconocimiento a las siguientes personas e Instituciones que hicieron posible, con su valioso aporte, la realización de este trabajo:

Profesores de la Cátedra de Periodoncia y estudiantes del Postgrado en esa especialidad, de la

Facultad de Odontología de la UCV, por su asesoramiento en la toma de las muestras.

Cátedra de Microbiología, por haberme permitido la realización de este trabajo.

Srta. Milagros Díaz y Sr. Raúl Colina, de la Unidad de Microscopía Electrónica "Dr. Raúl García Arocha", de esta Facultad, por su valiosa colaboración en el procesamiento del material mostrado en las microfotografías.

Al personal del Hospital Veterinario del Fuerte Tiuna, por haberme ofrecido las facilidades necesarias para la obtención del suero de caballo empleado en la preparación de los medios de cultivo para micoplasmas.

Departamento de Medios de Cultivo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", por permitirme la preparación de algunos medios y soluciones utilizadas.

A mi marido e hijo, por la tolerancia y comprensión.

BIBLIOGRAFIA

1. Barile, M. F. y Sheingorn A... 1960. The isolation and cultivation of a filterable form resembling pleuropneumonia-like organisms from the human dental pulp. Report of a case. O.S., O.M., O.P. 13(6): 756-760.

2. Bechara, F. y Mazzali de Ilja R., 1990. Estudio acerca de la presencia de micoplasmas en la cavidad bucal. En preparación.

3. Burnet, G. W. y Gilmore, E., 1959. Incidence and distribution of oral PPLo and L-organism. J. Dent. Res. 38: 632-636.

4. Carranza, F.A. Jr., Saglie R. Newman M. G. y Valentín P.L., 1983. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. J. Periodontol. 54 (10): 598-617.

5. Carranza, F.A. Jr., 1984. The role of microorganisms in periodontal disease; en: Glickmans's clinical Periodontology, 6ª edición. Philadelphia, W.B. Saunders.

6. Clyde, W.A., 1964. Mycoplasmas species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol. 92: 958-965.

7. Cole, B.C. Aldridge, K.E., Sullivan, G.J. y Ward, J. R., 1980. Mycoplasma-dependent activation of normal mouse lymphocytes: requirement for functional T lymphocytes in the cytotoxicity reaction mediated by Mycoplasma arthritidis. Infect. Immun. 30(1): 89-98.

8. Dajani A. y Ayoub E.M., 1969. Mycoplasmicidal effect of polymorphonuclear leucocyte extract. J. Immunol. 102 (3): 698-702.

9. Engel, L. D. y Kenny, G. E., 1970. Mycoplasma salivarium in human gingival sulci. J. Periodontol. Res. 5: 163-171.

10. Freedman, H. L., Listgarden, M. A. y Taichman, N. S., 1968. Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. J. Periodontol. Res. 3:313-317.

11. Jung, J., Carranza, F. A. y Newman, M. G., 1981. Scanning electron-microscopy of plaque in Papillon-Lefèvre syndrome. J. Periodontol. 52 (10): 442-446).

12. Kumagai K., Iwabuchi T., Hinuma Y., Yuri K e Ishida N., 1971. Incidence, species and significance of mycoplasma species in the mouth. J. Infect. Dis. 123 (1): 16-21.

13. Matsuura M., Set K., Watanabe T. y Horkawa T., 1978. Observation of delayed and immediated hypersensitivity reactions in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium, M. orale and M. hominis. Pág. 58-63. En: Proceeding of the Japanese Society of Mycoplasmaology (V Annual Congress).

14. Mazzali R. y Taylor-Robinson D., 1971. Behaviour of T-mycoplasmas in tissue culture. J. Med. Microbiol. 4:125-138.

15. Mazzali de Ilja R., 1978. Comportamiento de una cepa de Mycoplasma orale tipo 1 contaminante de células HEp-2. Revista del Instituto Nacional de Higiene XI (1-2): 45-52.

16. Mazzali de Ilja R., 1989. Aspectos cualitativos y cuantitativos de la contaminación de cultivos celulares por micoplasmas. Presentado durante el IX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica, Caracas 23-29 de abril. Resumen publicado en revista Bionotas, N° 10, 1989.

17. Moore, W.E.C., Holdeman L. V., Smibert, R. M., Good I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. y Ranney, R. R., 1982a. bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. Infect. Immun. 38(2): 651-667.

18. Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Smibert, R.M., Hash, D.E., Burmeister, J.A. y Ranney, R.R., 1982b. Bacteriology of severe periodontitis in young adults humans. Infect. Immun. 38(3): 1137-1148.

19. Morton, H.E., Smith, P.F., Williams, N.B. y Eickenberg, C.F., 1951. Isolation of pleuropneumonia-like organisms from human saliva: a newly detected member of the oral flora. J. Dent. Res. 30 (3): 415-421.

20. Newman, M.G., Saglie, R., Carranza, F.A. Jr. y Kaufman, A.K., 1984. Mycoplasma in periodontal disease. Isolation in juvenile periodontitis. J. Periodontol. 55(10): 574-580.

21. Parkinson, C.F. y Carter, P.B., 1975a. Phagocytosis of Mycoplasma salivarium by polymorphonuclear leucocytes and monocytes. Infect. Immun. 11 (2): 405-414.

22. Parkinson, C.F., 1975b. Histamine release from human leucocytes when stimulated by Mycoplasma salivarium. Infect. Immun. 11 (3): 595-597.

23. Perrone, M. y Mazzali de Ilja R., 1987. Influencia de micoplasmas en la enfermedad periodóntica. Acta Odontol. Venezol. XXV (2): 259-267.

24. Razin, S., Michman y Shimshoni, Z., 1964. The occurrence of Mycoplasma (Pleuropneumonia-like organisms, PPLo) in the oral cavity of dentulous and edentulous subjects. J. Dent. Res. 43 (3): 402-405.

25. Razin, S., Banai M., Gamliel H., Polliack A., Bredt W. y Kahane, I., 1980. Scanning electron microscopy of mycoplasma adhering to erythrocytes. Infect. Immun. 30 (2): 538-546.

26. Sabelli, C.A. y Provano, S.H., 1985. Enfermedades periodontales. Etiología y mecanismos de agresión. Bacteriol. Clín. Argent. 2-4 (1-2-3): 22-28.

27. Saglie R., Newman, M.G., Carranza, F.A. y Pattison, G.L., 1982a. Bacterial Invasion in gingiva in advanced periodontitis in humans. J. Periodontol. 53: 217-222.

28. Saglie, R., Newman, M.G. y Carranza, F.A. 1982b. A scanning electron microscopic study of leucocytes and their intereaction with bacteria in human periodontitis. J. Periodontol. 53: 752-758.

29. Saglie, F.R., Carranza, F.A. Jr. y Newman, M.G., 1985. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. I. A. scanning and transmission electron microscopy study. J. Periodontol. 56 (10): 618-624.

30. Serene, T.P. y Anderson, D.L., 1967. Isolation of Mycoplasma from human root canals. J. Dent. Res. 46 (2): 396-399.

31. Shklair, I.L., Mazzarella, M.A., Gutekunst, R.R. y Kiggins, E.M., 1962. Isolation and incidence of pleuropneumonia-like organism from the human oral cavity. J. Bacteriol. 83:785-788.

32. Slots, J., 1982. Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease, págs. 27-45. En: Host-parasite interactions in periodontal diseases. Eds. Genco, R.J. y Mergenhagen, S.E., A.S.M. (USA).

33. Socransky, S.S., 1977. Microbiology of periodontal diseases. Present status and future considerations. J. Periodontol. 48 (9): 497-505.

34. Uchida A., Horizawa T., Matsuura M., y Watanabe T., 1981a. A preliminary study on isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques: the effect of sonication on viability of oral mycoplasmas. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28:111-116.

35. Uchida A., 1981b. Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28: 117-123.

36. Velleca, W.M., Bird, B.R. y Forrester, F.T., 1980. Laboratory Diagnosis of mycoplasmas infections. Course 8226-C. Publicado por el Center for Diseases Control, Atlanta, Ga. USA.

37. Watanabe, T., 1967. Biological and serological studies on oral mycoplasmas. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28: 117-123.

38. Watanabe, T., Mishima R., Fujita O., Horikawa T., Noguchi T., Ishizu T. y Kinoshita S., 1972. Possible role of mycoplasmas in periodontal disease. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 19:93-109.

39. Watanabe, T., Matsuura M. y Seto K., 1986. Enumeration, isolation and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (M. salivarium). J. Clin. Microbiol. 3 (6): 1034-1038.

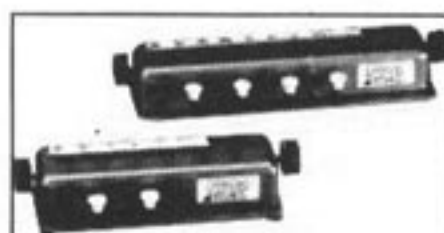
40. Watanabe, T., Shibata, K., y Hasegawa K., 1987. Production of immunoglobulin M (IgM) autoantibodies to IgG in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium cells grown in medium supplemented with rabbit serum. Infect Immun. 55 (1): 263-265.

Polylab c.a.

MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO



**Cambridge
Instruments**



CONTADOR
DE 5 y 9 TECLAS



MICRO CENTRIFUGA
PARA 24 PUESTOS



ROTADOR
PARA VDRL



BAÑOS DE MARIA
TERMOSTATICOS



CENTRIFUGA MACRO
8 PUESTOS



HORNO
ESTERILIZADOR



AGITADOR MIXER



MEZCLADOR
PIPETAS

Av. El Parque, Qta. Salecor, Urb. Las Acacias, Teléfonos: 61.27.07 - 62.48.34 - 62.05.07 - 62.52.22 - Fax: (02) 62.48.33

DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO DE:

D.I.

CHEMROY

PREVIEW®

LEFECO DIAGNOSTICS

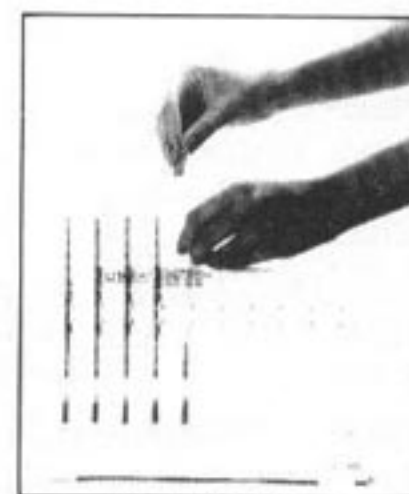


memmert

monoject

DIFCO

Dade™



SOPORTE WESTERGREN
CON PIPETAS DESCARTABLES