

ACTIVIDAD IN VITRO DE BISFOSFONATOS SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS. UN MECANISMO QUE IMPIDE LA ADHERENCIA BIOFILM DENTAL

V. MONTANGERO*, D L. CANIGIA**, E. ROLDAN***

* DDS. MdD Ph D. Universidad Maimónides Cat. Farmacología.

** MD. Hospital Alemán Bacteriología.

*** MdD ph D. Laboratorio Gador Dir. Científica.

RESUMEN

Streptococcus mutans (*S. mutans*) es el más cariogénico de todos los estreptococos orales. *S. mutans* es capaz de colonizar la superficie del diente y producir grandes cantidades de polisacáridos (DEXTRAN) adhesivo del biofilm a la superficie. Este microorganismo metaboliza varias glico proteínas salivales, siendo así responsable de la etapa inicial de las lesiones de caries y la formación de biopelículas orales.

Palabras claves: Streptococcus mutans - placa dental - bisfosfonato - pamidronato - olpadronato - etidronato.

ABSTRACT

Streptococcus mutans (*S. mutans*) is the most cariogenic oral streptococci all. *S. mutans* can colonize the tooth surface and produce large amounts of polysaccharides (DEXTRAN) adhesive to the surface of the biofilm. This organism metabolizes several salivary glycoproteins, thus being responsible for the initial stage of caries lesions and oral biofilm formation.

Keywords: *S. mutans* - dental plaque - bisphosphonate - pamidronate - olpadronate - etidronate.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los bisfosfonatos son compuestos ampliamente utilizados para el diagnóstico y tratamiento de una variedad de enfermedades óseas. Los bisfosfonatos se sintetizaron por primera vez hace un siglo por Von Baeyer y Hoffmann en 1897. Sin embargo, su uso comercial es relativamente reciente y data de 1960, cuando Blazer y Obras informó su uso en soluciones detergentes como agentes quelantes de calcio y magnesio. A principios de la década de 1960, el estudio de los mecanismos de acción de los diferentes compuestos sobre la caries dental, Procter & Gamble (P & G) observaron la afinidad de los bifosfonatos para superficies de cristal de hidroxiapatita. Sobre la base de este hallazgo y el clave apoyo académico, P & G continuó sus investigaciones con estos compuestos y probó etidronato disódico en salud oral. Debido a sus propiedades quelantes de calcio, etidronato

disódico demostró ser muy eficaz en la eliminación de depósitos de carbonato de calcio (caculus dental). En 1968, las investigaciones dieron como resultado la incorporación de etidronato disódico a las pastas dentales, siendo este el primer uso registrado de los bifosfonatos para uso dental.

OBJETIVO

Para evaluar la actividad in vitro de tres bisfosfonatos (olpadronato, pamidronato y el etidronato) contra dos **bacterias con acción en el biofilm:** Streptococcus mutans y Actinobacillus actinomycetemcomitans. Streptococcus mutans (*S. mutans*) es una bacteria que se encuentra comunmente en la biopelícula dental que produce sustancia dextran, que da la adherencia a la superficie dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

En este estudio se utilizó: una cepa de *Streptococcus mutans*, una bacteria en forma de cocos gram-positivo-responsable de la etapa inicial de lesiones de caries, y una cepa de *Actinobacillus actinomycescomitans*, un bacillus aerobios Gram-negativa asociada con la enfermedad periodontal. Ambas cepas se aislaron de la colección de cepas de laboratorio y se almacenó almacenaron a -70°C . Las dos cepas se cultivaron en agar sangre de oveja y agar chocolate, respectivamente.

Soluciones de bisfosfonato

Tres soluciones acuosas. 6% se prepararon con cada bisfosfonato: olpadronato (pH 4), etidronato (pH 5) y pamidronato (pH 8,1). Estas soluciones madre se diluyeron adicionalmente con agua o en un medio de cultivo celular para producir 3% y 1,5% de soluciones para la prueba de difusión en agar y el análisis de supervivencia, respectivamente.

Método para evaluar la acción inhibitoria: método de difusión.

Medio de cultivo celular: Mueller Hinton agar sangre de oveja y agar chocolate.

Inóculo: La suspensión bacteriana se ajustó a una turbidez de 0,5 escala de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC / ml).

Procedimiento

Cada placa de Petri (9 cm de diámetro) se inoculó con cada suspensión bacteriana de *S. mutans* cultivadas en agar de sangre de oveja y *A. actinomycescomitans* cultivada en agar chocolate. Dos agujeros fueron hechos en cada placa de agar (cada agujero tenía de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad). Los agujeros se llenaron a continuación con 80 l de cada 3% y la solución de bisfosfonato 1,5%. De incubación: Las

placas se incubaron durante 48 h a 37°C , en atmósfera aerobia enriquecida con CO_2 . Lectura: Las lecturas se hicieron visualmente, la medición de los diámetros de las zonas de inhibición, utilizando un calibre con una precisión de $\pm 0,5$ mm.

Método para evaluar la acción bactericida y bacteriostática: Análisis de supervivencia.

Medio de cultivo celular: BHI (infusión de cerebro y corazón) agar.

Inóculo: suspensión bacteriana de aproximadamente 1×10^6 CFU / mL.

Procedimiento: La suspensión bacteriana se incorporó a los 3% y 1,5% de soluciones de bisfosfonato, previamente preparados en medios de cultivo de células para alcanzar una concentración final de aproximadamente 1×10^6 UFC / mL. Este procedimiento se repitió para cada microorganismo ensayado. Un control de cada microorganismo se preparó de la misma manera (volumen final del tubo 5 ml). Resultados: Los resultados se expresan como la media \pm SD del logaritmo (base 10) de unidades formadoras de colonias (UFC) en diferentes momentos, para cada solución. Definición de actividad bactericida: actividad bactericida se define como un $\text{ffl } 3 \log_{10}$ CFU / ml, disminución en el recuento de colonias del inóculo inicial y actividad bacteriostática se definió como una $\text{ffl } 2 \log_{10}$ CFU / mL, en el recuento de colonias del inóculo inicial.

RESULTADOS

Valuación de la actividad inhibitoria

Los diámetros de la zona de inhibición para cada cepa por duplicado en mm (expresados como media y desviación estándar) se muestran en la Tabla 1. Diámetros de zona Tabla 1: Inhibición (mm) alrededor de 3 bifosfonatos a dos concentraciones diferentes para cada cepa. Los datos se expresan como media y SD.

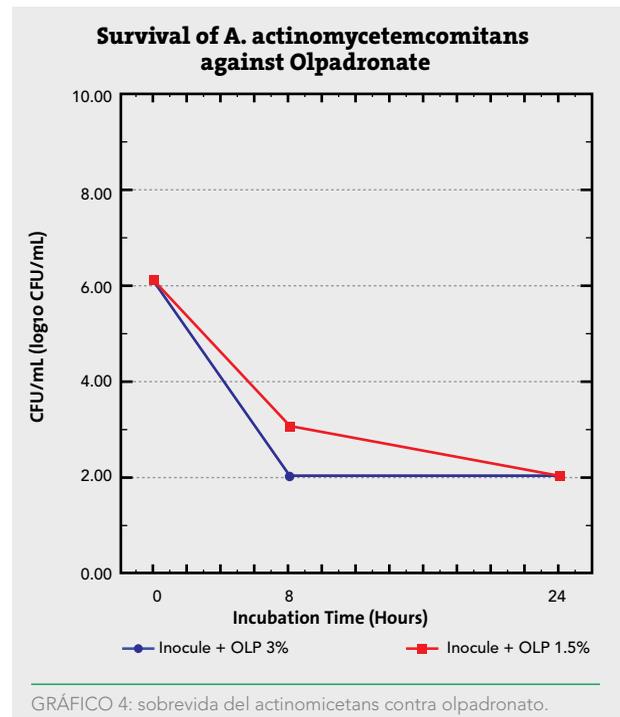
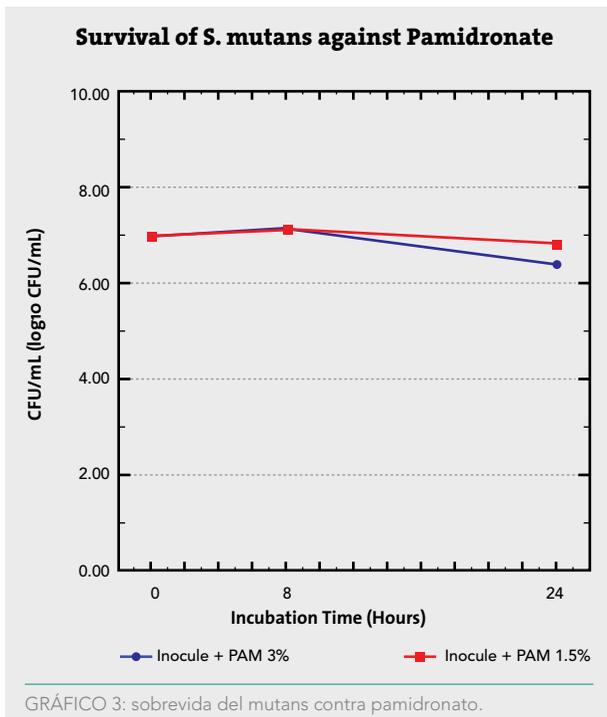
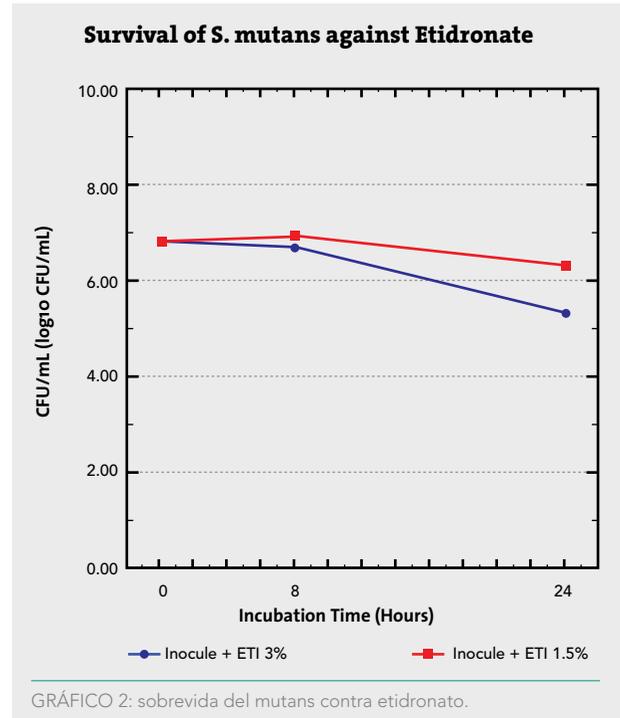
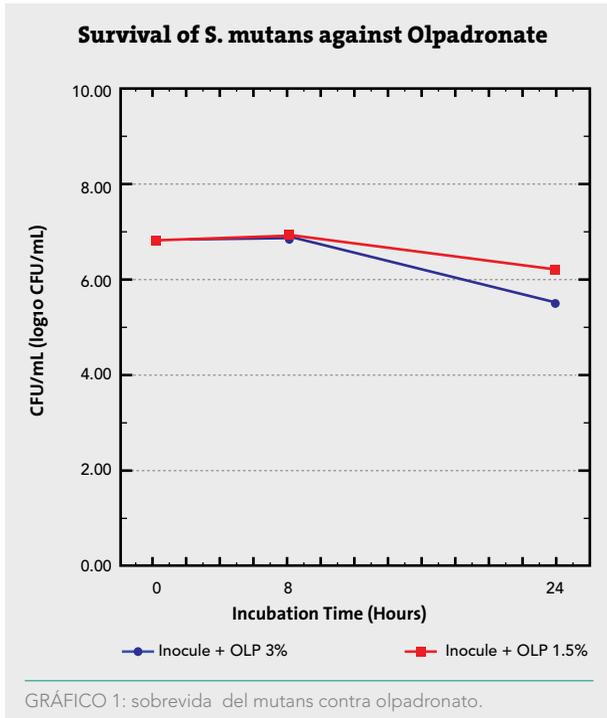
TABLA 1

Microorganisms/concentrations	Bisphosphonates (Mean and SD in mm)					
	Olpadronate		Etidronate		Pamidronate	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Streptococcus mutans</i>						
Solution 3%	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0
Solution 1.5%	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>						
Solution 3%	19.5	0.7	6.5	0.7	6.0	0.0
Solution 1.5%	15.5	0.7	6.0	0.0	6.0	0.0

Evaluación de la bactericidal y actividad bacteriostática

Los recuentos de colonias (\log_{10} CFU / mL), expresados como valores medios \pm SD a las 8 y 24 horas para cada concentración de bisfosfonato, se muestran

en la Tabla 2. Estos resultados se representan en las Figuras 1 a 6. Tabla 2: Actividad de 3 bisfosfonatos: olpadronato (OLP), etidronato (ETI) y pamidronato (PAM) contra *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans*. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.



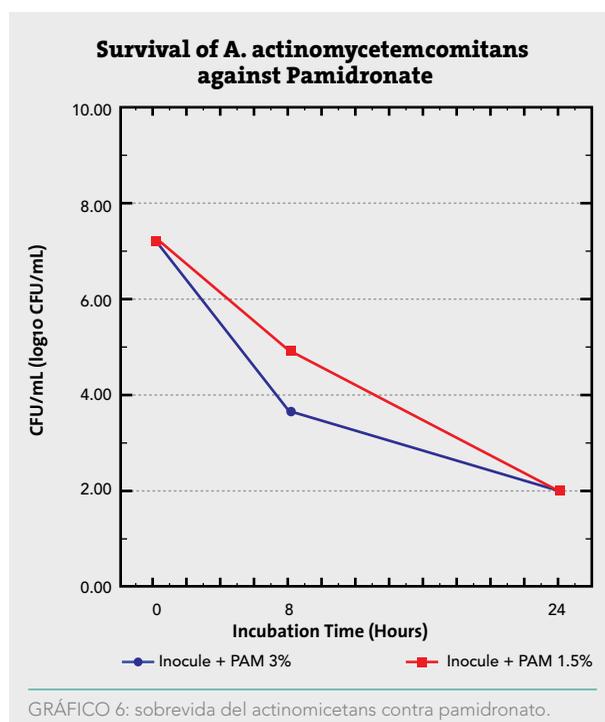
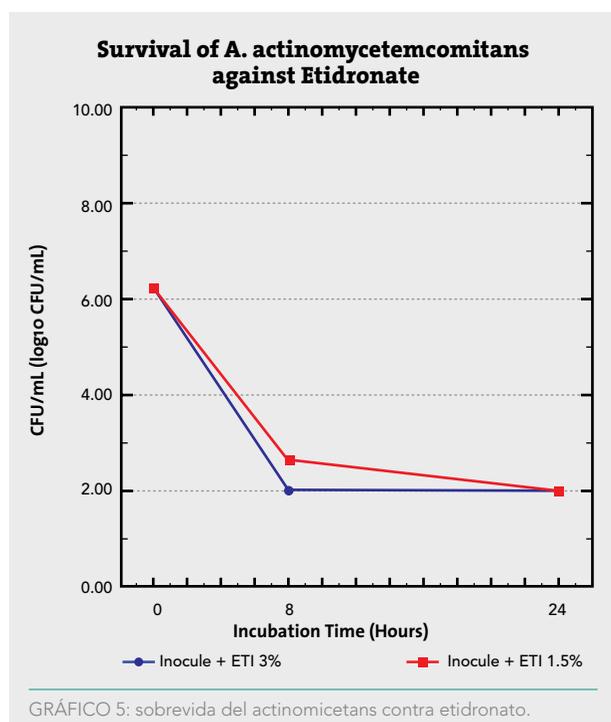


TABLA 2

Microorganisms	Colony counts (log ₁₀ CFU/mL) after 0, 8 and 24 hours of incubation		
	0 h (mean±SD)	8 h (mean±SD)	24 h (mean±SD)
<i>Streptococcus mutans</i>			
Inocule + OLP 3%	6.82±1.28	6.90±2.05	5.51±0.39
Inocule + OLP 1.5%	6.82±1.28	6.93±2.07	6.24±0.55
Inocule + ETI 3%	6.82±1.28	6.70±2.02	5.32±0.03
Inocule + ETI 1.5%	6.82±1.28	6.93±2.07	6.35±0.64
Inocule + PAM 3%	7.06±0.08	7.20±1.16	6.48±0.34
Inocule + PAM 1.5%	7.06±0.08	7.18±1.02	6.90±0.21
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>			
Inocule + OLP 3%	6.18±0.21	2.00±0.00	2.00±0.00
Inocule + OLP 1.5%	6.18±0.21	3.11±0.05	2.00±0.00
Inocule + ETI 3%	6.18±0.21	2.00±0.00	2.00±0.00
Inocule + ETI 1.5%	6.18±0.21	2.70±0.12	2.00±0.00
Inocule + PAM 3%	7.20±0.07	3.45±0.32	2.00±0.00
Inocule + PAM 1.5%	7.20±0.07	4.78±0.12	2.00±0.00

DISCUSIÓN

En este trabajo queda demostrado que los bisfosfonatos etidronato, pamidronate y olpadronate inhiben el desarrollo y crecimiento sobre el *Streptococcus mutans* en concentraciones que remedan las que se pueden hallar en la cavidad oral luego de la admi-

nistración de dosis clínicas útiles de estos compuestos. En efecto los estudios de Montangero Degrossi et al muestran, con la utilización de pamidronato y olpadronato marcados con Tc 99m, la presencia de actividad en la cavidad bucal durante los primeros

minutos y las horas siguientes a la administración de los compuestos. La misma decae luego de unas horas para desaparecer por completo luego de 24 horas; quedando adherido a la caries dental. Es decir, se puede especular con un efecto antibacteriano transitorio en esa localización.

Además, otros trabajos de nuestro grupo muestran que la ingesta de bisfosfonatos en pacientes sanos o con osteoporosis presentan eliminación por saliva. Cuando los bisfosfonatos se encuentran secretados en la saliva, rápidamente se fijan a los cristales de apatita de esmalte dentina y cemento, en mayor cantidad sobre los cristales rotos, los procesos cariosos, abrasiones, atriciones, etc. También, en estudios clínicos ensayados con alendronato, otro bisfosfonato que contiene nitrógeno y que fue administrado en forma diaria o semanal durante 6 a 12 meses (20-22), los autores observaron que los pacientes no presentaron problemas de caries ni enfermedad. Si bien los ensayos no estaban diseñados para cuantificar ese tipo de observación, la misma merece verificarse en estudios ad-hoc.

La acción sobre el *S. mutans* es bacteriostática, mientras que sobre otras bacterias integrantes del biofilm, ejercen una acción bactericida. Con el accionar de estos bisfosfonatos sobre las bacterias del biofilm este perdería el potencial agresivo sobre los tejidos dentarios y muco-gingivales. El mecanismo de acción anti-bacteriano no ha sido un motivo de este estudio, pero los bisfosfonatos conservan las propiedades "detergentes" del compuesto original y ella podría ser una explicación. En efecto, no solo bacterias pero otros agentes infecciosos como tripanosomas y el *E. granulosus* (chagas) han mostrado susceptibilidad a la exposición de estos compuesto.

En 1995 se introdujo el uso de algunos bisfosfonatos en el manejo de las metástasis óseas de tumores sólidos y del mieloma. Los efectos secundarios a su uso son infrecuentes, no obstante se ha descrito a nivel internacional, principalmente luego del 2003 la aparición ocasional de osteo-necrosis avascular de los hueso maxilares. Estos son definitivamente frecuentes en los pacientes tratados con el ácido zolendronato y pamidronato por vía intravenosa y en forma prolongada (más de dos años), aumentando el riesgo cuando no existe una correcta higiene bucal. En estos pacientes no parece existir un efecto profiláctico de los bisfosfonatos administrados sistémicamente sobre las condiciones higiénicas dentales, no obstante el uso de dosis mayores. Se ha recomendado adoptar medidas de higiene especiales y monitoreo cercano

en estos pacientes para minimizar la incidencia de osteo-necrosis. Pero no debe confundirse esta situación con la idea aquí desarrollada que tiene diferencias críticas. El acercamiento que aquí se postula es el de observar un efecto secundario beneficioso en pacientes que reciben bisfosfonatos en bajas dosis, mayormente por la indicación de osteoporosis. El mismo consiste en la prevención de la formación de placas y cálculos por las cantidades del bisfosfonatos que se elimina en la cavidad bucal y los incorporados a dentífricos. Estos pacientes no tienen las condiciones debilitantes de los que padecen cáncer óseo. Estos reciben esquemas posológicos bastantes más agresivos. La idea es aplicable en pacientes tratados con pamidronato oral o su nuevo derivado el olpadronato oral. Ambos, a las dosis clínicas inducen una moderada supresión metabólica de solo el 35 al 50% y, por consiguiente, son poco agresivos para el remodelaje y angiogénesis del hueso maxilar. De esta forma, con estos compuestos y usos, y no necesariamente con otros, podría manifestarse el efecto secundario positivo sobre la higiene dental.

Reconocimiento

Los bisfosfonatos fueron obsequiados por Gador SA, Buenos Aires y además se recibió de esa compañía un grant parcial para publicar estos datos. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. National Osteoporosis Society. "Drug Treatment". U.K. National Osteoporosis Society. Retrieved 7 August 2012.
2. Van Beek E, Cohen L, Leroy I, Ebetino F, Löwik C, Papapoulos S (November 2003). "Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates". *Bone* 33 (5): 805-11. doi:10.1016/j.bone.2003.07.007. PMID 14623056.
3. Van Beek E, Löwik C, van der Pluijm G, Papapoulos S (1999). "The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates". *J Bone Miner Res* 14 (5): 722-9. doi:10.1359/jbmr.1999.14.5.722. PMID 10320520.
4. Uzzan, B; et al. (2007). "Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies". *Bone* 40 (6): 1581-7. doi:10.1016/j.bone.2007.02.019. PMID 17409043. Retrieved 2012-07-13.
5. Fleisch H (2002). "Development of bisphosphonates". *Breast Cancer Res* 4 (1): 30-4. doi:10.1186/bcr414. PMC 138713. PMID 11879557.