



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“ESTUDIO *IN VITRO* E *IN SITU* DE ALGUNOS FACTORES  
QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE LA PELÍCULA  
ADQUIRIDA”**

TESISTA:

OD. CATALINA MELCHORA FRANCIA

DIRECTOR:

PROF. DR. LUIS JOSÉ BATTELLINO

CÓRDOBA, 2005



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA**



**“ESTUDIO *IN VITRO* E *IN SITU* DE ALGUNOS  
FACTORES QUE INFLUYEN EN LA  
FORMACIÓN DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA ”**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE DOCTORA EN  
ODONTOLOGÍA PERTENECIENTE A LA  
ODONTÓLOGA CATALINA MELCHORA  
FRANCIA.**

**CÓRDOBA, AGOSTO de 2005.**

**DIRECTOR DE TESIS :**

**Dr. LUIS JOSÉ BATTELLINO**

**COMISIÓN DE TESIS :**

**Dra. SUSANA TEREZA DORRONSORO**

**Dr. SALVADOR LUIS BELLAVÍA**

**Dr. JUAN AGUSTÍN CURTINO**

## **DEDICATORIA:**

A mis hijos Ignacio, Paula,  
Manuel y Agustín  
que me comprendieron y  
acompañaron con su amor  
en este camino.

A mis Padres y a mi Hermana  
Alejandra por su  
incondicional presencia.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi Maestro, Profesor Doctor Luis José Battellino, con respeto y admiración, el reconocimiento a su enorme generosidad, a sus ejemplos y enseñanzas que contribuyeron a mi formación humana y profesional.

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

Al Sr. Decano de la Facultad de Odontología, Prof. Dr. Nazario Kuyumlliam.

A los Doctores Susana Tereza Dorronsoró, Salvador Luis Bellavía y Juan Agustín Curtino, miembros de la Comisión de Tesis, por los consejos y asesoramiento brindados durante el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Rosa Guadalupe Lissera por su colaboración y por su amistad.

A la memoria de la Doctora Elba Rosa Luna Maldonado de Yankilevich, quién formó parte de nuestro equipo de trabajo.

A la Doctora Ana Isabel Azcurra por sus innumerables, valiosos y desinteresados aportes.

A la Doctora Raquel Viviana Gallará quién generosamente colaboró en diversas partes de los procedimientos técnicos.

A la Bioquímica María Alejandra Bojanich por su contribución en la realización de las pruebas microbiológicas.

Al Señor Ricardo Germán Reyna, del Departamento de Medios Audiovisuales de la Facultad de Odontología, por su valiosa y gentil colaboración durante todas las etapas de desarrollo de esta Tesis.

Al Señor Eduardo Riado, del Laboratorio de Técnica de Prótesis de la Facultad de Odontología, por su ayuda, siempre amable, en la elaboración de los dispositivos intrabucales utilizados en las experiencias *in situ*.

A la Doctora Mabel Brunotto por sus consejos durante la realización de las pruebas de fraccionamiento electroforético.

A la Doctora Miriam Strumia, de la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, por su colaboración en la realización de los espectros de absorción infrarrojos.

A las Docentes de la Cátedra "B" de Química Biológica, Bioquímicas Silvina Raquel Barembaum y Silvia Edith Calamari.

A los Odontólogos Cecilia Moro, Vanina Brandalise, Gustavo Mercapide y Pablo Falasconi, agregados a la Cátedra "A" de Farmacología y Terapéutica por colaborar en las experiencias *in situ*.

Al personal docente de la Cátedra "A" de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Odontología.

A todas aquellas personas que colaboraron directa e indirectamente en la elaboración de esta Tesis.

A mis amigos y compañeros, gracias.

---

---

***HAY UNA FUERZA MOTRIZ MÁS PODEROSA QUE EL  
VAPOR, LA ELECTRICIDAD Y LA ENERGÍA ATÓMICA:  
LA VOLUNTAD.***

***ALBERT EINSTEIN***

---

---



---

---

# CERTIFICACIONES

---

---





## **PUBLICACIONES REALIZADAS CON MOTIVO DE ESTE TRABAJO DE TESIS.**

---

- “EFECTO DEL XILITOL SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA BAJO CONDICIONES *IN VITRO*”. Med. Oral, 2003, **5**,13-21.
- “ESTUDIO *IN VITRO* DE ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA”. Med. Oral , 2004, **6**,5-11.
- “EFECTO DE POLIALCOHOLES SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA Y DE PLACA BACTERIANA BAJO CONDICIONES *IN SITU* “. Med. Oral, 2004,**6**,47-53.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

SECCIONES	PÁGINAS
DEDICATORIAS_____	I
AGRADECIMIENTOS_____	II – III
FRASE_____	IV
CERTIFICACIONES_____	V – VII
PUBLICACIONES_____	VIII
RESUMEN_____	1 – 2
SUMMARY_____	3 – 4
I- INTRODUCCIÓN_____	5 – 7
II- OBJETIVOS_____	8
1-GENERALES_____	8
2-ESPECÍFICOS_____	8 – 9
III- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS_____	10 – 25
IV-MATERIALES Y MÉTODOS_____	26
1-ENSAYOS <i>IN VITRO</i> _____	27 – 30
2-ENSAYOS <i>IN SITU</i> _____	30 – 34
3-ANÁLISIS DE LOS ELUATOS_____	34 – 37
VI- RESULTADOS_____	38
1-ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> _____	38 – 61
2-ESTUDIOS <i>IN SITU</i> _____	62 – 68
VII- DISCUSIÓN_____	69 – 82
VIII- CONCLUSIONES_____	83 – 84
IX- BIBLIOGRAFÍA_____	85 – 97

## RESUMEN

**Objetivo.** El propósito de este estudio fue investigar la influencia de factores físicos, físico-químicos y químicos sobre la formación de película adquirida, bajo condiciones *in vitro* e *in situ*. **Materiales y Métodos.** Se llevó a cabo un estudio experimental en dos fases. En la primera de ellas (*in vitro*) se incubaron a 37°C por 90 min. una mezcla de hidroxiapatita y sobrenadante de saliva mixta, para determinar la influencia de la disponibilidad de proteínas, el pH, el agregado-sustracción de ciertos iones, la temperatura, la fuerza iónica y diversos inhibidores-removedores de placa bacteriana sobre la formación de película adquirida. En la segunda fase (*in situ*) se evaluó el efecto de una mezcla de xilitol, sorbitol y manitol, aplicada como enjuagatorios y gomas de mascar, sobre la formación de película adquirida utilizando bloques dentarios humanos insertos en retenedores que fueron colocados durante 120 min. en ambos maxilares de voluntarios jóvenes. **Resultados.** Bajo condiciones *in vitro*, la retención por hidroxiapatita de las proteínas salivales (formación de película adquirida) aumenta proporcionalmente a su concentración en el sistema, de acuerdo a un fenómeno de adsorción relativamente específico. La adsorción de proteínas alcanzó su máximo a los 30 min. de incubación, a pH 6,0 y a la temperatura de 24°C. La incorporación de iones calcio al sistema de ensayo incrementó la formación del integumento de manera proporcional a la concentración del ión. El fosfato produjo un efecto inverso. El agregado de clorhexidina (0,12% y 0,24%), fluoruro de sodio (0,10%) y hexetidina (0,10%) no afectó significativamente la formación del integumento. En cambio, la adición de xilitol, sorbitol y manitol produjo una significativa reducción en la

cantidad de proteínas (28-31%), glucoproteínas (20-24%) y  $\alpha$ -amilasa (41-44%) retenidas por hidroxapatita, en forma proporcional a la concentración del azúcar-alcohol. Esta reducción fue parcialmente revertida por la adición de calcio iónico (3, 6 y 12 mM). La formación de placa bacteriana a partir de una cepa de *Streptococcus mutans* o de flora aeróbica total de saliva fue alrededor del 40% menor cuando la película adquirida se formó en presencia de xilitol 10%. Bajo condiciones *in situ*, el tratamiento con enjuagatorios conteniendo una mezcla de xilitol, sorbitol y manitol no modificó en forma significativa el contenido de proteínas, glucoproteínas,  $\alpha$ -amilasa y ácido siálico de la película adquirida, ni la producción de placa bacteriana. Por el contrario, el consumo de gomas de mascar edulcoradas con dichos polialcoholes redujo la adsorción al esmalte de todos los componentes analizados, y la formación de placa dental.

**Conclusiones.** La producción de película adquirida representa un fenómeno complejo que, entre otros factores, depende tanto de la calidad de los fluidos bucales como de las condiciones en que se desarrolla el fenómeno. La presencia de xilitol, sorbitol y manitol, al reducir la producción de la película adquirida, disminuye la colonización microbiana de los dientes, lo cual sumado a otras propiedades, convierten a estos azúcares-alcoholes en agentes recomendables para prevenir las enfermedades bucales dependientes de la placa bacteriana.

**Palabras clave:** película adquirida, saliva, hidroxapatita, proteínas, calcio, removedores de placa, polialcoholes.

## SUMMARY

**Objective.** The purpose of this study was to investigate the influence of physical, physical-chemical and chemical factors on the formation of acquired pellicle, upon conditions *in vitro* and *in situ*. **Materials and Methods.** An experimental study in two phases was carried out. In the first one of them (*in vitro*) they were incubated to 37°C for 90 min. a mixture of hydroxyapatite and supernatant of mixed saliva, to determine the influence of the availability of proteins, the pH, the aggregate-subtraction of certain ions, the temperature, the ionic force and diverse inhibiting-removers of bacterial plaque on the formation of acquired pellicle. In the second phase (*in situ*) the effect of a mixture of xylitol, sorbitol and mannitol was evaluated, applied as mouth rinses and chewing gums, on the formation of acquired pellicle using human dental blocks inserts in retainers that were placed during 120 min. in both jawbones of young volunteers. **Results.** Upon *in vitro* conditions the retention by hydroxyapatite of the salivary proteins (formation of acquired pellicle) enlarges proportionally to its concentration in the system, according to a phenomenon of adsorption relatively specific. The adsorption of proteins reached its maximum to the 30 min. of incubation, to pH 6,0 and to the temperature of 24°C. The incorporation of ions calcium to the system of trial increased the formation of the integument in a proportional way to the concentration of the ion. The phosphate produced an inverse effect. The aggregate of clorhexidine (0,12% and 0,24%), sodium fluoride (0,10%) and hexetidine (0,10%) did not affect significantly the formation of the integument. On the other hand, the addition of xylitol, sorbitol and



mannitol produced a significant reduction in the quantity of proteins (28-31%), glycoproteins (20-24%) and  $\alpha$ -amylase (41-44%) retained by hydroxyapatite, in proportional form to the concentration of the sugar-alcohols. This reduction partly was reverted by the addition of ionic calcium (3, 6 and 12 mM). The formation of bacterial plaque from a strain of *Streptococcus mutans* or of salivary total aerobic flora was around the 40% smaller when the acquired pellicle was formed in the presence of xylitol 10%. Upon *in situ* conditions, the processing with mouth rinses containing a mixture of xylitol, sorbitol and mannitol did not modify in significant form the content of proteins, glycoproteins,  $\alpha$ -amylase and sialic acid of the acquired pellicle, neither the production of bacterial plaque. On the contrary, the consumption of chewing gums sweetened with said polyalcohols reduced the adsorption to enamel of all the components analyzed, and the formation of dental plaque. **Conclusions.** The production of acquired pellicle represents a complex phenomenon that, among others factors, depends so much of the quality of the oral fluids as of the conditions in which develops the phenomenon. The presence of xylitol, sorbitol and mannitol, to reduce the production of the acquired pellicle, diminishes the microbial colonization of the teeth, which added to other properties, they convert to these sugars-alcohols in recommendable agents to prevent the illnesses oral dependent of the bacterial plaque.

**Key words:** acquired pellicle, saliva, hydroxyapatite, proteins, calcium, antiplaque agents, polyalcohols.

## I. INTRODUCCIÓN

La película adquirida (PA) es una delgada membrana biológica que se deposita en la superficie de los elementos dentarios (1), como resultado de la adsorción de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también otras provenientes de productos microbianos y celulares (2). La adsorción de dichas biomoléculas no ocurre exclusivamente sobre tejido adamantino, sino que existe PA en todas las superficies bucales (cemento, mucosas, epitelio bucal queratinizado y no queratinizado), aparatos protésicos y restauraciones(3).

La retención de biomoléculas por parte del esmalte dentario es un fenómeno de naturaleza selectiva. Los grupos que demuestran mayor afinidad por la Hidroxiapatita adamantina (HAp) son las proteínas y glucoproteínas ricas en prolina, estaterinas, histatinas, cistatinas y  $\alpha$ -amilasa salival, muchas de las cuales se encuentran fosforiladas (4). En menor proporción participan en la constitución de PA seroalbúmina, anhidrasa carbónica, inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), fracciones del complemento, péptidos que provienen de la fragmentación de proteínas salivales y la enzima glucosiltransferasa de origen bacteriano (5,6).

La formación de la PA involucra fuerzas de atracción de distinta naturaleza entre las superficies dentales y las biomoléculas dispersas en los líquidos que las rodean. Dado que los cristales de HAp del material dentario poseen carga negativa superficial debido a la localización de grupos fosfatos en la zona más externa, para su neutralización son

atraídas cantidades equivalentes de calcio iónico provenientes de saliva. Como las proteínas contienen grupos aniónicos (carboxilatos, fosfatos, sulfatos), se establecen uniones electrostáticas con el calcio y de esta manera quedan adsorbidas a la HAp. Por su parte, las proteínas catiónicas interaccionan directamente con los grupos fosfato de la HAp a través de enlaces iónicos (7). Luego de estas atracciones electrostáticas ocurren otras interacciones entre las biomoléculas retenidas y la HAp que contribuyen a reforzar la adherencia de la PA. A través de reacciones catalizadas por enzimas provenientes de la saliva, bacterias, células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares, la PA va modificando su composición hasta alcanzar el estado de madurez (4).

Esta película proteica desempeña importantes funciones relacionadas con la integridad del diente. Debido a su permeabilidad selectiva, la PA regula el arribo a la superficie dental de ácidos procedentes de la alimentación o formados durante el metabolismo microbiano, previniendo de tal modo su desmineralización (8,9), así como también regula el intercambio de iones calcio, fosfatos y fluoruros durante los procesos de remineralización (10). Además reduce el desgaste dentario debido a las fuerzas de fricción que se desarrollan durante la masticación y por la presencia de mucoproteínas hidrófilas posee la propiedad de retener agua, evitando la desecación de las superficies adyacentes (11). A pesar que la saliva está sobresaturada de calcio y de fosfato, la presencia en la PA de inhibidores de la precipitación -como estaterinas y proteínas ricas en prolina- evita que ocurra el depósito de compuestos minerales

insolubles sobre las superficies dentales. De esta manera la PA previene la formación del sarro dental (12,13).

Si bien cumple importantes funciones protectoras, la PA también provee sitios para la adhesión de microorganismos bucales (14,15), permitiendo su unión en los eventos iniciales de la formación de la Placa Bacteriana (PB), estructura cuya presencia es condición necesaria para el posterior desarrollo de las afecciones de mayor prevalencia en el aparato estomatognático: la caries dental y la enfermedad periodontal.

Atento a estos antecedentes y por cuanto es poco conocido cómo influyen diversos factores físicos, físico-químicos y químicos relacionados con el depósito de la PA, se llevó a cabo un estudio experimental que pudiera servir no sólo para la adquisición de conocimientos básicos sobre el tema, sino también para evaluar las posibles implicancias clínicas que de ellos puedan derivar.

## **II. OBJETIVOS**

### **1-GENERALES:**

- Estudiar la influencia de factores propios de la saliva y de removedores-inhibidores de placa bacteriana sobre la formación de película adquirida, bajo condiciones in vitro.
- Determinar la capacidad de producción de película adquirida in situ en voluntarios durante la aplicación de removedores-inhibidores de placa bacteriana.

### **2-ESPECÍFICOS:**

#### **2-1- BAJO CONDICIONES IN VITRO:**

- Evaluar cómo influyen en la formación de la película adquirida variables tales como:
  - disponibilidad de proteínas
  - pH del medio
  - temperatura
  - tiempo de incubación
  - agregado de iones
  - fuerza iónica
  - agregado de inhibidores-removedores de placa bacteriana.

**2-2- BAJO CONDICIONES *IN SITU*:**

- Comparar el perfil de proteínas de la película adquirida antes y después de la aplicación de agentes inhibidores-removedores de placa bacteriana.
- Establecer la aptitud de la película adquirida formada *in situ* para permitir la colonización bacteriana, en condiciones basales y posteriores al tratamiento con agentes inhibidores-removedores de placa bacteriana.

### III. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS (MARCO TEÓRICO)

En el ambiente bucal se producen múltiples interacciones físico-químicas entre los elementos que lo conforman. Por una parte los dientes, su tejido de sostén (periodonto) y la mucosa bucal; y por el otro la fase líquida que los rodea, representada por la saliva y el líquido crevicular (fluido gingival).

La zona superficial más externa del diente que contacta con la saliva es el esmalte, un tejido de origen ectodérmico de gran dureza, que contiene una estructura especial: los prismas adamantinos, los cuales están formados por cristales de **hidroxiapatita** (HAp). Este compuesto mineral constituye el 95% del peso del esmalte, estando representado el resto del tejido por materia orgánica (2-3%) y agua (3-4%). En la composición de los cristales participan tres especies iónicas en proporciones definidas, lo cual da lugar a la siguiente relación molar :



aunque también pueden estar presentes otros iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^-$ ), ya sea formando parte de la red cristalina o bien adsorbidos en su superficie.

Si bien no puede desarrollar procesos metabólicos básicos que caracterizan a los tejidos blandos, como la glucólisis y la respiración, el esmalte dentario es un sistema dinámico capaz de producir un conjunto de procesos, entre los que podemos mencionar intercambio iónico con la saliva, fenómenos de disolución (desmineralización) y precipitación

(remineralización), e interacciones con los componentes orgánicos de saliva, del fluido gingival y de los microorganismos bucales (16).

La HAp del esmalte dental es un material biogénico, o sea una estructura inorgánica generada a partir de un ser vivo, dentro de sus propios procesos de desarrollo, adaptación, crecimiento y formación (17), capaz de interactuar con ciertas sustancias presentes en el sistema bucal, lo cual posibilita la instalación de películas biológicas sobre las superficies sólidas. Además del esmalte, estas cubiertas se forman sobre el cemento, epitelio bucal queratinizado y no queratinizado, aparatos protésicos y restauraciones, cada una de ellas con una composición diferente. La cutícula mejor conocida es la **película adquirida del esmalte**, o simplemente **película adquirida (PA)**.

La PA es una capa delgada, amorfa, resultado de la adsorción de diversas biomoléculas de origen salival o procedentes del líquido crevicular, cuya formación es un proceso bastante rápido y selectivo (18), y que posee una composición química muy compleja y heterogénea. Mediante procedimientos químicos e inmunológicos se ha demostrado la presencia de proteínas, glúcidos y lípidos; los dos primeros, al menos en parte, se encuentran combinados bajo la forma de glucoproteínas (2,19).

Entre los principios proteicos identificados en la PA se encuentran mucinas de alto peso molecular, diversas proteínas ácidas ricas en prolina (PRPs, PRP1, PRP2, PRP3, PRP4, PIFs, PRPf) (20), estaterinas (21), histatinas, cistatinas, IgA secretoria (2) y  $\alpha$ -amilasa (22), algunas de ellas al estado fosforilado o glicosilado. En menor proporción participan



también seroalbúmina, anhidrasa carbónica, IgG, IgM, diversas fracciones del complemento y glucosiltransferasa de origen microbiano. Existen evidencias de que varias proteínas presentes en la saliva total son enzimáticamente degradadas, originando péptidos que tienen afinidad por la HAp, de manera que este integumento resultaría de la unión no sólo de proteínas (simples y conjugadas) intactas, sino también de fragmentos producidos por la proteólisis parcial de esas mismas macromoléculas (23).

Los componentes glucídicos de la PA formada naturalmente comprenden principalmente azúcares neutros (glucosa, galactosa, fucosa) y aminoazúcares (glucosamina, galactosamina); en menor proporción participan también otros glúcidos derivados, como el ácido siálico (24). Aunque la función de los carbohidratos presentes en la película no está totalmente aclarada, existen indicios que los involucran en el proceso de colonización, dado que muchas de las adhesinas de la superficie microbiana se unen a la porción glucídica de los receptores localizados en la PA (25).

Los lípidos constituyen alrededor del 20% del peso seco de la PA. Alrededor del 80% corresponde a glucolípidos, el 15% a lípidos neutros (ácidos grasos libres, glicéridos y colesterol), y la fracción restante a fosfolípidos (fosfoglicéridos y esfingomielinas) (26). La extracción de la fracción lipídica reduce casi a la mitad la capacidad de la película de retardar la difusión de ácido láctico; este efecto se revierte prácticamente en su totalidad al reincorporar los lípidos de la PA (27). Por el carácter

hidrofóbico de sus moléculas, los lípidos podrían estar implicados en la adhesión microbiana, de modo que actuarían previniendo la desmineralización por la doble propiedad de regular la difusión de los ácidos originados por la fermentación bacteriana de azúcares y de modular la colonización de la superficie dental (28)

La formación de la película adquirida involucra una combinación de diversas fuerzas de unión (iónicas, hidrofóbicas, enlaces por puente de hidrógeno y atracciones de van der Waals) que se establecen entre las superficies bucales (esmalte dental, mucosas, etc.) y los componentes orgánicos que se encuentran dispersos en la saliva. Como la superficie externa del esmalte dental está cargada negativamente debido a la acumulación de los grupos fosfatos que posee la HAp, para neutralizar esas cargas se retienen iones calcio provenientes de la saliva, los cuales a su vez sirven de “puente” que posibilitan la unión de los componentes de la saliva y del líquido crevicular a través de sus extremos aniónicos (7).

La afinidad de las proteínas por la HAp adamantina está condicionada por su estructura molecular, en particular por la presencia de grupos eléctricamente cargados, y por la disponibilidad de sitios de unión que a nivel superficial dispone el adsorbente. Las proteínas ricas en prolina y las estaterinas poseen moléculas bastante polares, ya que la región amino terminal se encuentra altamente ionizada por la presencia de residuos de fosfoserina, los cuales aumentan las atracciones electrostáticas con la superficie adamantina. Sin embargo, la fuerza de unión es mayor en el caso de las estaterinas, ya que es más alta la

densidad de los sitios de unión a la HAp. En el caso de las cistatinas, si bien cuentan con mayor afinidad para unirse al adsorbente, los sitios disponibles a nivel de este sólido son más escasos (2,4). Se ha propuesto que las fosfoproteínas salivales y las glucoproteínas sulfatadas de bajo peso molecular forman parte de las uniones iniciales en la formación de la película adquirida, a través de un proceso de intercambio iónico o a la formación de puentes mediada por cationes (29).

El depósito de película adquirida se completa entre los 60 y 120 minutos siguientes a la exposición de las superficies dentarias al ambiente bucal (30,31), aunque investigaciones más recientes indicarían que el máximo desarrollo se alcanza a los 30-60 minutos (32). Estudios realizados *in situ* han mostrado que en los 30 segundos siguientes a la exposición de discos de hidroxiapatita a la saliva humana quedan retenidas varias proteínas cuyos pesos moleculares se extienden de 34 kD a 160 kD, en tanto que a los 20 minutos de exposición son detectadas 15 proteínas adsorbidas, con pesos moleculares que cubren el rango de 15 kD a 160 kD (33).

Existen indicios señalando que la formación de película ocurre en dos etapas. En la etapa inicial, que dura hasta los 30 minutos, la cubierta proteica aumenta tres veces su espesor. Al comienzo es una discreta película orgánica depositada sobre el esmalte que evoluciona hacia una morfología predominantemente globular, lo cual se explica por el hecho de que las proteínas que se agregan lo hacen como micelas (34). Tales micelas globulares corresponden principalmente a proteínas ricas en

prolina que existen como tales en la saliva, similares a las micelas de la caseína láctea. En contacto con las superficies dentarias, estos glóbulos se fusionan formando largas unidades que cubren por entero el esmalte. Al completarse esta etapa, la película consiste en una multicapa globular constituida por micelas que tienen un diámetro de 20 a 300 nm dispuestas en forma de racimos. Los iones calcio mantienen la integridad de la estructura multiglobular: dado que la superficie de los glóbulos presenta una alta densidad de cargas negativas, se produce la unión con dicho catión, que de tal modo actúa como puente entre esas macromoléculas. Merced a su estructura globular, la película inhibe la precipitación de calcio y fosfato, pese a que la saliva se encuentra sobresaturada en estos iones. En la segunda etapa, por acción de enzimas proteolíticas propias de la saliva o provenientes de bacterias se altera la conformación molecular de la película, con la consiguiente pérdida de la estructura globular y de la capacidad de formar dispersiones acuosas (35). La primera etapa es cuantitativamente la más importante, en tanto la segunda, correspondiente al estadio de maduración del integumento, tiene importancia funcional por cuanto posibilita la colonización bacteriana.

Las proteínas que forman parte de la película adquirida muestran diferentes patrones de adsorción. Así, las estaterinas y algunas proteínas ricas en prolina se adsorben muy rápidamente; una segunda clase de proteínas, como  $\alpha$ -amilasa y cistatinas lo hacen más lentamente, en tanto que en un tercer grupo se incluyen otras proteínas ricas en

prolina e histatinas, las cuales no aparecen sino hasta transcurridas alrededor de dos horas de exposición del elemento dentario a la saliva, lo que marcaría el tiempo necesario para completar la formación del integumento (36).

La naturaleza de la superficie sobre la que se depositará la PA influye en el fenómeno de adsorción, al menos en las etapas iniciales. Así, pequeñas diferencias en la composición química de los sólidos con los que contactan las proteínas salivales pueden causar importantes desigualdades en la composición del integumento. Se han comprobado diferencias en la integración de la película según la misma haya sido formada sobre superficies naturales del diente, materiales de restauración, prótesis o aparatos de ortodoncia (37-40). De igual modo, el integumento formado sobre el cemento radicular posee una composición química muy diferente al que se deposita sobre el esmalte, en parte debido a las especiales características químicas y estructurales de este tejido y también porque la película producida sobre el cemento contiene mayor proporción de proteínas provistas por el líquido crevicular (41,42).

La composición del integumento condiciona la colonización bacteriana, debido a que la presencia de algunas biomoléculas o sus residuos actúan como receptores mediando los fenómenos iniciales de adherencia. Al respecto es necesario recordar que la composición de la película no permanece constante en todos los estadios de su formación. El integumento formado en un primer momento se modifica merced al

procesamiento que llevan a cabo las enzimas contenidas en la saliva provenientes de las bacterias, de las células epiteliales descamadas y de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos que ingresan a la cavidad bucal transportados por el líquido gingival. De esta manera, diversos componentes salivales adsorbidos en un primer momento a la HAp son rápidamente degradados, razón por la que no aparecen en el integumento que ha madurado por algún tiempo. Por ello, la composición de la PA es distinta según se forme bajo condiciones *in vivo* o *in vitro* (20). Las proteínas más susceptibles de degradación enzimática son algunas proteínas ricas en prolina, estaterinas e histatinas, mientras que las cistatinas,  $\alpha$ -amilasa y otras proteínas ricas en prolina son más resistentes y persisten en la PA (36).

Dado que la formación de película se produce dentro de un complejo sistema donde todas las proteínas procedentes de la saliva deben competir por los limitados sitios de unión disponibles en la superficie del esmalte, otro factor que condiciona la selectiva incorporación de esas macromoléculas es la relación proteínas / HAp, esto es, la oferta de proteínas para una determinada superficie de adsorción. Cuando la disponibilidad de sitios de unión es baja, sólo logran unirse a la HAp aquellas proteínas que poseen alta afinidad por el compuesto mineral (verbigracia estaterinas), en tanto que si la oferta de sitios crece, el proceso no resultará tan selectivo y podrán adsorberse también otras especies proteicas, por ejemplo proteínas ricas en prolina e histatinas (36).

Si bien las características cualitativas de la película permanecen más o menos constantes, su composición varía de acuerdo a la procedencia de la saliva y del tipo y duración del estímulo aplicado para su obtención. Se han comprobado diferencias intra e interindividuales; por cuanto las distintas regiones de la boca son alcanzadas por diferentes tipos de saliva (parotídea, submaxilar o submandibular), cada una con un contenido proteico específico. Tales variaciones locales en la composición de la PA repercuten posteriormente en la instalación de la microflora relacionada con las enfermedades bucales prevalentes.

A partir de la PA y debido al fenómeno de colonización microbiana se constituye la **placa bacteriana** (PB), principal responsable de las enfermedades de la boca. Se trata de una cubierta microbiana firmemente adherida a regiones supra e infragingivales del elemento dentario, cuyo desarrollo comprende diferentes etapas. Una vez instalada la película adquirida los microorganismos pioneros se adhieren a ella, proliferan y forman colonias, produciéndose posteriormente la agregación de formas filamentosas y espiroquetas para constituir una cubierta cohesiva. Muchos productos originados por las bacterias de la placa reaccionan con los tejidos subepiteliales, provocando una respuesta inflamatoria (aumento de la vascularización y diapédesis leucocitaria). A su vez la placa bacteriana localizada en surcos, fosas y fisuras provoca la lesión de caries, que comienza con la disolución localizada del material inorgánico de la superficie dental por sustancias ácidas originadas a partir del metabolismo de los hidratos de carbono por parte de las bacterias de la

placa, y que continua con procesos degradativos de la materia orgánica que llevan a la destrucción de los tejidos dentarios. A partir de ambos tipos de placa, por un fenómeno de depósito de material inorgánico, pueden formarse masas duras y mineralizadas (**cálculos**), las cuales exacerban la respuesta inflamatoria de los tejidos blandos (43).

El proceso de formación de la placa bacteriana implica el reconocimiento específico de los sitios de unión a nivel de la película por parte de los microorganismos bucales. En dicho reconocimiento intervienen tanto los receptores de superficie como las adhesinas microbianas. Así, por ejemplo, la adhesión de *Streptococcus mutans* depende principalmente de la presencia de aglutininas de origen parotídeo, de modo que las lesiones de caries son más frecuentes en las regiones posteriores de la boca, influenciadas por este tipo de saliva (44,45).

Una situación especial se plantea con la  $\alpha$ -amilasa, una de las proteínas integrante de la película adquirida producida tanto a partir de saliva parotídea y submaxilar como de saliva total (46,47). Esta enzima tiene la propiedad de unirse selectivamente y con alta afinidad a varias especies de estreptococos bucales (47-49). Sólo aquellos animales cuya saliva exhibe actividad amilásica son capaces de fijar diversas especies de estreptococos, por lo que se ha sugerido que la habilidad para unirse a la enzima desempeña un rol importante en la colonización de los tejidos bucales. Además de servir como receptor para la adhesión inicial de gérmenes al diente, la  $\alpha$ -amilasa facilita la adherencia interbacteriana y /o



retarda su depuración bucal. Por último, como la enzima que está ligada a gérmenes podría iniciar la degradación del almidón, posibilitaría que los microorganismos de la placa lo aprovechen como fuente energética (50,51).

De los antecedentes expuestos hasta aquí, surge que la presencia de la PA sobre la superficie dentaria es importante por varias razones. En primer lugar, porque actuando como una membrana selectivamente permeable ubicada entre el diente y el ambiente bucal regula la difusión de ácidos provenientes de los alimentos y bebidas u originados por acción microbiana y a la vez de iones calcio, fosfato y fluoruro, con lo cual controla los procesos de mineralización y desmineralización (8,27,52,53). El efecto protector frente a la erosión depende del espesor alcanzado por el integumento, de modo que cuanto mayor sea éste menor será la susceptibilidad a la disolución ácida, lo cual puede explicar la diferente resistencia que presentan las distintas regiones de la cavidad bucal (53,54).

En segundo lugar, la PA provee sitios receptores que permiten la adhesión inicial de los gérmenes durante la formación de la placa bacteriana, con lo cual modula la colonización de los tejidos bucales de la cual dependen tanto la caries dental como la enfermedad periodontal (14,15,47,55-58). Todo ello equivale a decir que la PA es el antecedente necesario para la formación de la PB.

Es por ello que la inhibición de la formación de la PB, su eliminación o atenuación constituyen procedimientos recomendables para la

prevención de dichas enfermedades bucales. Esto ha constituido una de las medidas primarias en el cuidado de la salud bucal, y como tal ha contribuido en la declinación de la prevalencia de la caries dental en las últimas tres décadas. En consecuencia, para completar el procedimiento mecánico de cepillado dental, especialmente en aquellas zonas de difícil acceso, frecuentemente se recomienda el empleo de sustancias químicas con actividad antimicrobiana capaces de inhibir o remover la placa bacteriana (**agentes antiplaca**) (59-63). En base a su composición química y/o mecanismo de acción, estos agentes han sido clasificados en las diferentes categorías (surfactantes, antisépticos, antimicrobianos, antiadherentes, modificadores enzimáticos y no enzimáticos) (64). A continuación se expondrán brevemente las principales características de algunos de ellos.

□ **Clorheridina (CHX).** Es un surfactante catiónico, de la familia química de las bis-biguanidas, utilizado como agente antiplaca desde el año 1969 (65). Posee un amplio espectro de acción, con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram(+) -incluyendo *Streptococcus mutans*- Gram(-), anaerobios facultativos, hongos y levaduras (66,67). Existen algunas evidencias que indican que la alta afinidad de este fármaco por las bacterias posiblemente obedezca a su propiedad de unirse a grupos negativos de la pared microbiana (68), con lo cual interfiere en el transporte a través de la membrana; secundariamente, CHX coagula el contenido intracelular. Bajo la forma de digluconato (0,12%) e incorporada a enjuagatorios bucales se emplea no sólo en el

control de la placa bacteriana, sino también como coadyuvante en el tratamiento convencional de la gingivitis y de diversas enfermedades periodontales (69-73). Utilizada como agente antiplaca, su acción es puramente tópica, ya que no puede atravesar el epitelio bucal (65,68).

Una de las propiedades sobresalientes de la CHX es la gran sustentividad que exhibe, esto es, su capacidad de ser retenida en la cavidad bucal desde donde es liberada posteriormente para poder actuar, lo cual permite un efecto bacteriostático prolongado (64,74,75).

□ **Hexetidine (HEX).** Es otro miembro del grupo de las bisbiguanidas con acción antiplaca, cuya actividad se relaciona con la estructura de su molécula, ya que la presencia de grupos alquilo-terminales la hace mas activa frente a actinomyces. La presencia de puentes metileno aumenta tanto la duración de su acción como su actividad frente a gérmenes del tipo bacteroides y fusobacterium (64).

□ **Fluoruros.** Durante los últimos 70 años, los fluoruros han sido ampliamente evaluados y en la actualidad son bien comprendidos los mecanismos básicos de la absorción, distribución, biotransformación y excreción. Químicamente son combinaciones (sales) del flúor con elementos metálicos. Además de ellos, existen otros compuestos en cuya constitución interviene el flúor, desde los cuales es posible la liberación del elemento halógeno. Entre los fluoruros inorgánicos se destacan los de sodio y estaño.

La principal propiedad de los fluoruros es su habilidad para intervenir en los fenómenos de desmineralización y remineralización, ya que

modulan dichos procesos al inhibir la pérdida de minerales en las superficies cristalinas y aumentar la reconstrucción de los cristales de hidroxiapatita del diente (76-79).

El fluoruro disminuye la desmineralización por varias vías. Por un lado reduce la producción de ácidos por parte de las bacterias (80), alterando la adherencia, crecimiento y metabolismo de los gérmenes (81). Además, disminuye la solubilidad de los cristales de HAp al aumentar los enlaces por puente de hidrógeno y las uniones electrostáticas dentro del cristal, formando una trama más estable y por ende menos soluble. Por último, al producir la captación del ión en la superficie cristalina (formación de fluorhidroxiapatita) reduce la disolución del material inorgánico, retardando la desmineralización.

□ Diversas combinaciones de fluoruros con CHX e iones de zinc han sido estudiadas en la última década (82). Los resultados revelaron que la combinación CHX-F<sup>-</sup> reduce la cantidad de unidades formadoras de colonias en forma equivalente a la disminución del consumo de glucosa, lo cual indica que la inhibición de la acidogenicidad de la placa era debida a un poder bactericida más que a un efecto bacteriostático. Por su parte, el NaF y el ZnF<sub>2</sub> no reducen el número de bacterias, ya que deprimen el metabolismo de la placa sin afectar su viabilidad, en tanto que la combinación CHX-Zn-F<sup>-</sup> disminuyen el número de bacterias y el metabolismo glucídico (83).

□ **Azúcares-alcoholes.** Los azúcares dietarios, en especial la sacarosa, son degradados mediante un mecanismo glicolítico por los

microorganismos de la placa bacteriana, generando un medio ácido que favorece el establecimiento de la microflora cariogénica y contribuye a la virulencia de los gérmenes (84). Esto sugiere que la sustitución dietética parcial de la sacarosa y otros azúcares fermentables por azúcares que no son metabolizados por los microorganismos tendría un importante efecto preventivo de caries. Por esta razón, y dado que los azúcares fermentables no pueden ser completamente eliminados de nuestra dieta, el uso de edulcorantes no fermentables, como xilitol, o poco fermentables de los cuales manitol y sorbitol son los más conocidos, constituyen medidas preventivas que contribuyen en forma importante a la salud bucal.

- **Xilitol.** Es un azúcar-alcohol natural de cinco carbonos (pentitol), que naturalmente se encuentra en muchas frutas y vegetales. Su uso está aprobado en numerosos países como endulzante incorporado a dulces, caramelos, gomas de mascar, productos asociados a la higiene bucal y en la industria farmacéutica y cosmética. Se caracteriza por la gran resistencia a la fermentación por parte de los microorganismos de la placa dental y como consecuencia de ello no es un productor de metabolitos ácidos (85). Tampoco existen evidencias acerca de adaptaciones por parte de los gérmenes de la placa frente al uso de este polialcohol, incluso después de largos períodos de tratamiento (86).

El efecto inhibitorio del desarrollo de *Streptococcus mutans* producido por el xilitol es consecuencia de la acumulación en el interior de la célula bacteriana de un derivado del polialcohol como metabolito no

metabolizable (éster fosfórico), lo cual además se traduce en una disminución de dichos gérmenes en saliva y en la cantidad de placa bacteriana. Cuando está presente en el ambiente bucal es capaz de desplazar la comunidad bacteriana hacia una microflora menos cariogénica y también de producir la selección de *Streptococcus mutans* con menor virulencia. Finalmente ha demostrado interferir en los procesos de desmineralización, por lo cual su uso constituye una medida favorecedora en los planes preventivos (86-88). Varios estudios clínicos han revelado una disminución de la caries dental asociada al consumo de xilitol (89-90).

- **Sorbitol** y **Manitol**. También presentes en el mercado, estos dos congéneres químicos (hexitoles) del xilitol se utilizan comercialmente con los mismos fines. Ambos compuestos son lentamente degradados por una cantidad de gérmenes de la placa, especialmente por *Streptococcus mutans*. A diferencia del xilitol, el sorbitol puede ser degradado por algunas bacterias de la placa, si bien debe reconocerse que la metabolización bacteriana de este polialcohol se produce a un ritmo bastante lento y produce principalmente etanol y ácido fórmico, mientras que el ácido láctico -con un efecto desmineralizante bastante potente- se forma en cantidades más bien menores (84,85). A pesar de ello, frecuentemente son incorporados a los preparados de uso comercial por su menor costo económico.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Saliva.** Se obtuvo saliva total no estimulada proveniente de cuatro donantes sanos (40-60 años), de acuerdo al procedimiento descrito por Jensen et al. (36). Durante la recolección, la saliva total fue mezclada con solución salina conteniendo azida sódica al 0,2%, de modo de alcanzar una concentración final del antimicrobiano del 0,02%. Inmediatamente después de su recolección, la saliva fue filtrada sobre un manto de gasa y centrifugada por 15 min. a 12.000 g. El sobrenadante límpido fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización. Este líquido, el cual representa la saliva mixta (SM), se empleó para los diferentes ensayos de formación de PA.
- **Hidroxiapatita (HAp).** Se utilizaron esferas de hidroxiapatita provista por Bio Rad (USA), con un área superficial de aproximadamente  $60 \text{ m}^2/\text{g}$ .
- **Especímenes dentarios.** Elementos dentarios sanos extraídos por razones de periodoncia u ortodoncia fueron lavados con agua de canilla y cepillados con solución detergente al 2%. Posteriormente se cortaron las porciones coronarias con instrumental rotatorio (discos de acero) y a partir de ellas se obtuvieron bloques longitudinales con una superficie aproximada de  $40 \text{ mm}^2$ , de 2 mm de espesor. Para evitar contaminación microbiana, estos especímenes dentarios se conservaron en solución de azida sódica 15mM. Previo a su utilización, cada bloque fue lavado con

solución detergente y pulido con pasta de pulir simple (piedra pómez-agua) mediante cepillos rotatorios. Finalmente se lavaron con agua destilada y se secaron mediante corriente de aire.

### 1- ENSAYOS *IN VITRO* (de rutina)

- **Formación de PA.** Se incubaron HAp y SM a 37° C durante 90min., en la proporción de 20 mg/mL, manteniendo el sistema con agitación constante. Al final de ese período, en el cual se alcanza el equilibrio entre adsorción y desorción de proteínas y glucoproteínas a la HAp (31), la mezcla fue centrifugada a 12.000 g por 10 min, desechando el sobrenadante. Para eliminar las proteínas y glucoproteínas débilmente unidas al adsorbente, el sedimento fue suspendido con solución salina y centrifugado por 10 min. a 12.000 g., descartando el líquido de lavado.
- **Elución de la PA.** Se realizó suspendiendo el sedimento con buffer fosfato 0,2 M pH 7,0, agitando la mezcla por 15 min. a 37° C. La suspensión fue centrifugada a 12.000 g por 10 min. y el sobrenadante se conservó a -20° C hasta los análisis, los cuales se realizaron dentro de las 96 hs.

Para conocer la proporción de proteínas de la SM que resultó adsorbida a la HAp y la efectividad del procedimiento de elución se realizaron ensayos de recuperación midiendo dichos compuestos en el sistema de incubación, en el sobrenadante y en los eluatos. Los



resultados mostraron que completada la incubación de SM con HAp, la suma del contenido de proteínas de los sobrenadantes y eluatos representó entre el 97 y 102 % de la cantidad inicial, correspondiendo a la fracción adsorbida alrededor del 28% de las proteínas salivales incorporadas al sistema. En promedio, aproximadamente el 90% de las proteínas y glucoproteínas adsorbidas fueron eluidas en un primer tratamiento con buffer fosfato 0,2 M pH 7,0, desorbiéndose en un segundo tratamiento alrededor del 9%. Finalmente, el tratamiento con NaOH 1 M proporcionó un 0,5% de proteínas. Por cuanto el perfil de proteínas en ambos eluatos resultó muy similar según el fraccionamiento electroforético, rutinariamente se trabajó con el primer eluato.

- **Efecto de la disponibilidad de proteínas.** En las experiencias realizadas para evaluar la formación de PA según la provisión de proteínas, se incubó HAp con cantidades variables de SM, sola o después de la adición de cantidades conocidas de albúmina humana o de suero sanguíneo humano (SSH).
- **Efecto del pH.** Previo a la incubación con HAp, el pH de la SM fue ajustado en un rango de 6,0 a 7,6 mediante la adición de pequeños volúmenes de HCl o NaOH 1M.
- **Efecto de iones seleccionados.** A la SM se le incorporaron soluciones concentradas de sales conteniendo las especies iónicas de interés (calcio, magnesio, cobre y fosfatos), hasta alcanzar la concentración deseada. Los controles se prepararon diluyendo en la misma proporción la SM con solución salina.

- **Efecto de la sustracción de iones calcio.** Previo a la incubación con HAp, a la SM se le adicionó oxalato de amonio sólido en cantidad equivalente para precipitar los iones calcio, ajustando el pH a 6,0 con buffer de ácido acético-acetato de sodio 0,2 M. La suspensión fue mantenida en reposo por 30 min., luego de lo cual fue centrifugada a 12.000 g por 10 min. y separado el sobrenadante para ser utilizado en la formación de PA. A los controles se les adicionó una cantidad equivalente de cloruro de amonio, continuando luego de la misma forma que en el grupo experimental.
- **Efecto de la temperatura.** Los ensayos realizados para evaluar esta variable se llevaron a cabo incubando la mezcla de SM e HAp a temperaturas constantes, en el rango de 24-43° C.
- **Efecto de agentes inhibidores-removedores de placa bacteriana.** Para evaluar el efecto de Clorhexidina (0,12% y 0,24%), Hexetidina (0,10%), Xilitol (10%), Sorbitol (10%), Manitol (10%) y Fluoruro de Sodio (0,10%), se incorporó a SM la cantidad necesaria de dichas drogas hasta alcanzar la concentración deseada, manteniendo luego la mezcla a 37° C por espacio de 5 min. antes de incubarla con HAp.
- **Efecto de la fuerza iónica.** Después de dializar por 24 hs. la SM contra agua deionizada, se le disolvió cantidades conocidas de NaCl hasta lograr la fuerza iónica que se deseaba obtener. Una vez que la sal fue disuelta, la SM fue incubada con HAp. La fuerza iónica de la SM resultó igual a la concentración de NaCl alcanzada.

- **Efecto del tiempo.** La incubación de HAp y SM se realizó como de rutina por diferentes intervalos de tiempo, desde 5 a 120 min.
- **Formación de placa bacteriana.** En estos ensayos se formó PA incubando un bloque dentario con 2 mL de SM durante 90 min. a 37° C. Finalizada la incubación, los especímenes dentarios fueron lavados dos veces con solución salina e incubados en aerobiosis durante 4 días a 37° C con 2,0 mL de caldo dextrano que contenía 50 µL de suspensión de *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175 o de flora aeróbica total de saliva, previa activación de ambas microfloras mediante cultivo por cuatro días a 37° C en caldo cerebro corazón hasta alcanzar una absorbancia equivalente a  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL. Completada la incubación, los especímenes dentarios se lavaron cinco veces mediante pases en agua destilada durante dos segundos cada uno. La desorción de la PA y de la PB adherida a ella se efectuó con solución de deoxicolato 0,1%, procediendo a la determinación de proteínas en los eluatos según lo recomendado por Distler et al. (91), utilizando para ello la técnica de Lowry et al. (92). Las operaciones de formación, lavado y desorción de la PA, para cada variable estudiada, se realizaron en idénticas formas a las descritas anteriormente.

## 2- ENSAYOS *IN SITU*

- **Selección de voluntarios.** Participaron cinco adultos jóvenes (22-23 años), de uno u otro sexo (2 varones y 3 mujeres), clínicamente sanos

y que al momento del examen odontológico no presentaban enfermedades o alteraciones del aparato estomatognático. Previo a su participación en el estudio, los voluntarios suscribieron el correspondiente consentimiento informado.

□ **Preparación del dispositivo de adsorción.** Se diseñaron retenedores removibles con flancos deacrílico vestibulares que permitían la inserción de bloques de dientes (Figuras 1 y 2) y que fueron contruidos a partir de impresiones parciales de maxilar superior e inferior de cada voluntario, de modo tal de poder realizar los ensayos en ambos maxilares de manera simultánea. Por su parte, los bloques de dientes fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

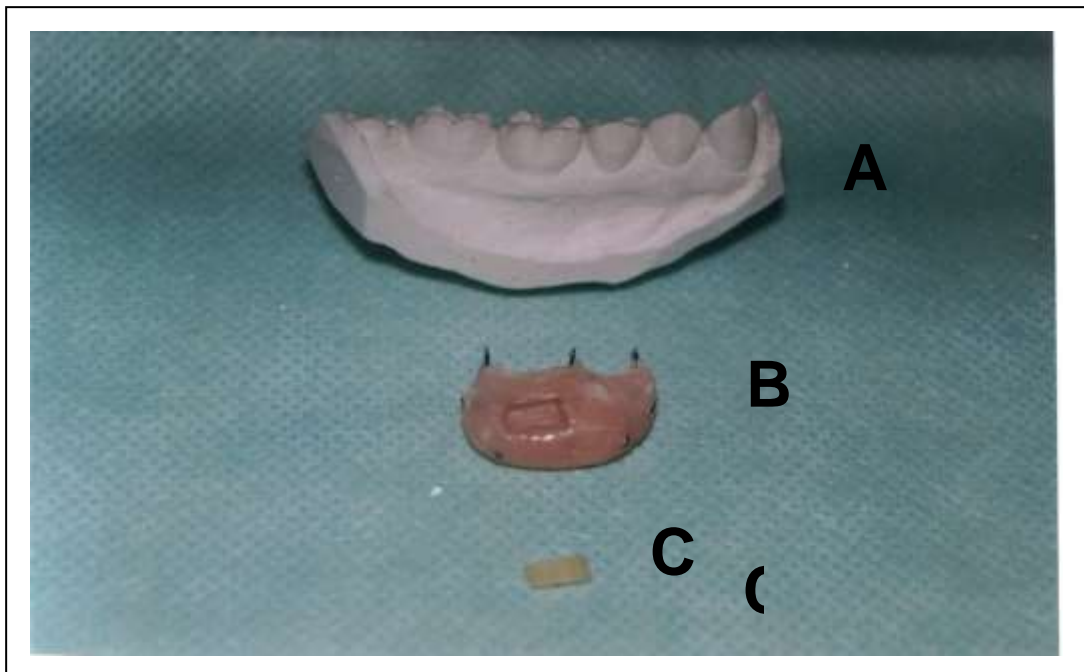


Figura 1. Componentes del sistema de adsorción. A) Modelo parcial en yeso de maxilar inferior. B) Retenedor deacrílico. C) Bloque de diente.



Figura 2 . Dispositivo de adsorción inserto en el modelo parcial de yeso, conteniendo el retenedor con el correspondiente bloque de diente.



Figura 3. Dispositivo de adsorción inserto en el maxilar inferior de un voluntario, conteniendo el retenedor de acrílico con el correspondiente bloque de diente.

□ **Formación de PA bajo condiciones similares a las fisiológicas**

Los bloques dentarios fueron insertados en los retenedores y estos colocados en la cavidad bucal de los voluntarios, previa higiene mediante cepillado (Figura 3).

En los experimentos destinados a evaluar los efectos de la mezcla de xilitol, sorbitol y manitol sobre la formación de PA se planificaron dos tipos de ensayos. En el primero de ellos, luego de instalados los dispositivos de adsorción (retenedores con su bloque dentario) en cada hemiarcada (superior e inferior) de los voluntarios, se les indicó la realización de un enjuagatorio durante 1 minuto con una solución conteniendo una mezcla en partes iguales de los tres azúcares-alcoholes hasta lograr una concentración final del 10% (**experimental**). Al día siguiente, los voluntarios repitieron el ensayo, realizando el enjuagatorio con agua destilada (**control**).

En la segunda experiencia, luego de la higiene bucal los voluntarios masticaron por 60 min. una goma de mascar conteniendo la mezcla de los tres polialcoholes al 1% (Topline®, ARCOR), recambiando el producto por otro igual durante los siguientes 60 min. (**experimental**). Transcurridas 24 hs se realizaron los **controles**, utilizando gomas de mascar edulcoradas con sacarosa (Chiclets®, ADAMS), en la forma descripta anteriormente. Para cada experiencia los bloques dentarios fueron retirados a las 2 hs. y se continuó con los procedimientos que se describen luego.

- **Desorción de la PA.** Completado el período de formación de la película, los retenedores fueron retirados de la boca y removidos los bloques dentarios, los cuales fueron enjuagados en agua destilada realizando cinco pases de 2 seg. cada uno. La PA se desorbió durante 15 min. a 37° C mediante buffer fosfato 0,2 M, pH 7,0.
- **Formación de placa bacteriana.** Los bloques dentarios conteniendo la PA fueron lavados en agua destilada e incubados en aerobiosis durante 4 días en caldo cerebro corazón al que se le adicionó una suspensión de *Streptococcus mutans* (cepa ATCC 25175) o de flora aeróbica total de saliva. Finalizada la incubación, los bloques dentarios se lavaron realizando cinco pases en agua durante 2 seg. cada uno y se desorbió la PB con buffer fosfato 0,2 M, pH 7,0.

### 3- ANÁLISIS DE LOS ELUATOS:

Se realizaron determinaciones de proteínas totales (92), glucoproteínas (93),  $\alpha$ -amilasa (94) y ácido siálico (95). En los ensayos *in vitro* el contenido de proteínas fue expresado como microgramos de proteínas totales por miligramo de HAp, el de glucoproteínas como nanogramos de glucosa por miligramo de HAp y el de  $\alpha$ -amilasa como microgramos de proteína por miligramo de HAp. Por su parte, en los ensayos *in situ* se utilizaron las mismas unidades para expresar la cantidad de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa adsorbidas por milímetro cuadrado de diente. El contenido de ácido siálico se expresó

como nanogramos de ácido siálico por milímetro cuadrado de diente. Una unidad de  $\alpha$ -amilasa corresponde a la cantidad de enzima que libera un micromol de maltosa por minuto, bajo las condiciones de ensayo. A partir de la actividad amilásica expresada en unidades de acuerdo a la actividad específica de la enzima salival purificada (1000 unidades por miligramo de proteínas) (96), se expresó la cantidad de amilasa adsorbida en microgramos de enzima por miligramo de HAp. La cantidad de PB se expresa como nanogramos de proteínas por milímetro cuadrado de superficie dentaria.

La especificidad de la técnica directa de cuantificación de glucoproteínas fue evaluada comparándola con las técnicas de aislamiento previo de dichos compuestos mediante distintos procedimientos: precipitación con ácido tricloroacético al 10%, etanol al 95% y ácido perclórico 0,75 M. Básicamente, estas técnicas produjeron los mismos resultados que los obtenidos con la técnica directa, razón por la cual esta última fue utilizada rutinariamente.

Para conocer el perfil proteico de los eluatos se realizó fraccionamiento electroforético según técnica en capa delgada SDS-PAGE (97), usando geles de poliacrilamida al 12,5% y efectuando la corrida a 200 V durante 50 min. en un aparato MINI PROTEAN II de BIO RAD. Después de la separación electroforética, las proteínas fueron localizadas sumergiendo los geles durante 2 hs. en solución de azul brillante de Coomassie R 250 al 0,1% disuelto en una mezcla de agua-metanol-ácido acético (5:5:2). Para la decoloración de los geles se



efectuaron lavados con una solución de ácido acético al 7,5% y etanol al 10%. La cuantificación de las fracciones proteicas se efectuó digitalizando los geles y determinando la intensidad de cada banda mediante la utilización de un programa de análisis y tratamiento de imágenes (Image ProPlus 4,0 Media Cybernetics).

### **Estudio del mecanismo de acción del Xilitol y demás polialcoholes.**

A los efectos de lograr una aproximación respecto al mecanismo de acción de Xilitol (Xil) y demás congéneres ensayados, se realizaron inicialmente dos tipos de ensayos: el primero dirigido a estudiar la posible acción de estos compuestos sobre el adsorbente y el restante para analizar la acción sobre la estabilidad de la PA ya formada. El primer tipo de ensayo se llevó a cabo tratando la HAp con la solución del polialcohol al 10% durante 30 min. antes de producir la incubación con SM. En el segundo, la PA ya formada incubando HAp y SM en las condiciones de rutina fue lavada con solución de Xil 10%.

Por otra parte, se estudiaron los espectros de absorción ultravioleta e infrarrojo de una solución de Xil al 10% sola y en presencia de Ca 3 mM.

### **Análisis estadístico.**

Los datos fueron resumidos utilizando medidas de tendencia central (media aritmética) y de dispersión (desviación estándar). Para establecer la existencia de diferencias o asociaciones estadísticamente significativas,

los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba t de Gosset-Student para datos apareados, utilizando el programa estadístico SPSS 8.

La fuerza de asociación entre variables se estimó por medio del análisis de regresión lineal simple, calculando en cada caso el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). El límite de significación para establecer diferencias o asociaciones con significación estadística fue fijado en el valor  $p = 0,05$  (98).

## V. RESULTADOS

### 1- ESTUDIOS *IN VITRO*:

- **Efecto de la disponibilidad de proteínas.** Los datos de la Tabla 1 indican que la cantidad de proteínas retenidas por la HAp, lo cual equivale a cantidad de PA artificial formada, aumentó en forma proporcional al incremento en la oferta de proteínas salivales.

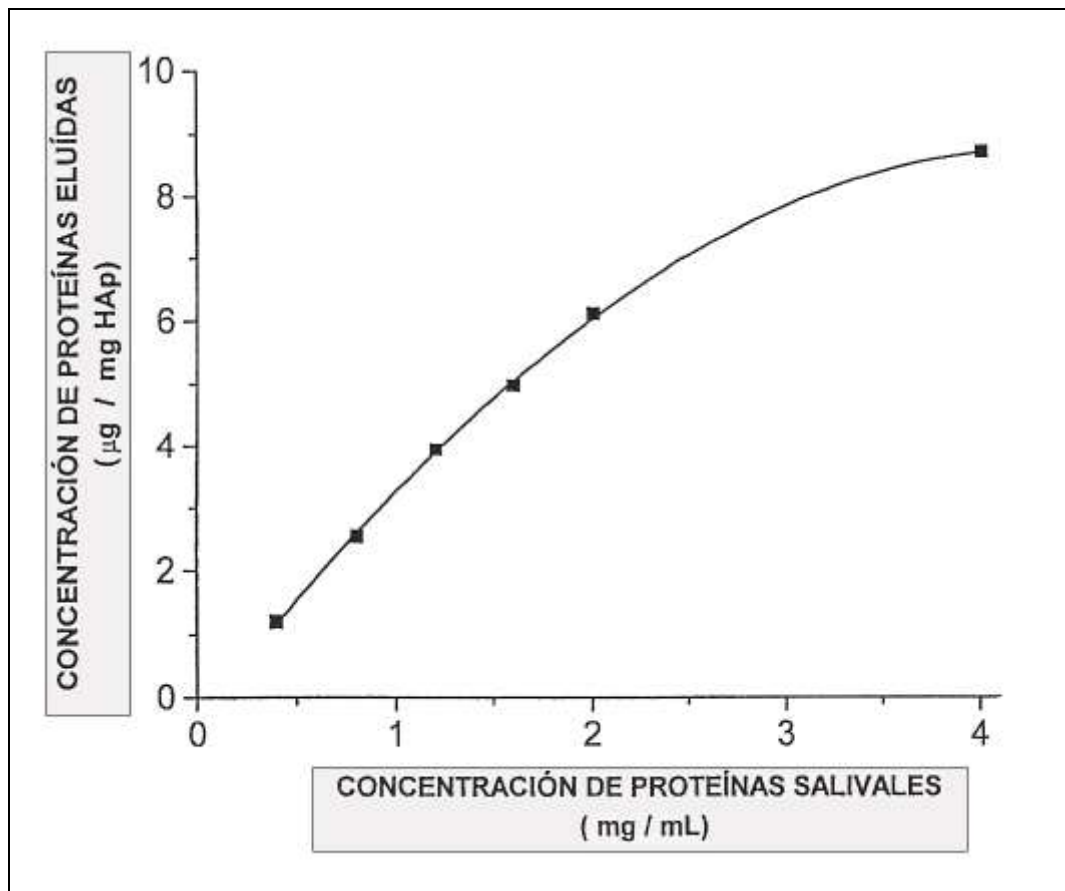
**TABLA 1. EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE PROTEÍNAS SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Proteínas Incubadas (mg)	Proteínas en PA ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
0,5	1,21 $\pm$ 0,12
1,0	2,45 $\pm$ 0,15
1,5	3,64 $\pm$ 0,18
2,0	4,97 $\pm$ 0,21
2,5	6,12 $\pm$ 0,13
5,0	8,82 $\pm$ 0,22

( $r = 0,941$ ;  $p < 0,0001$ )

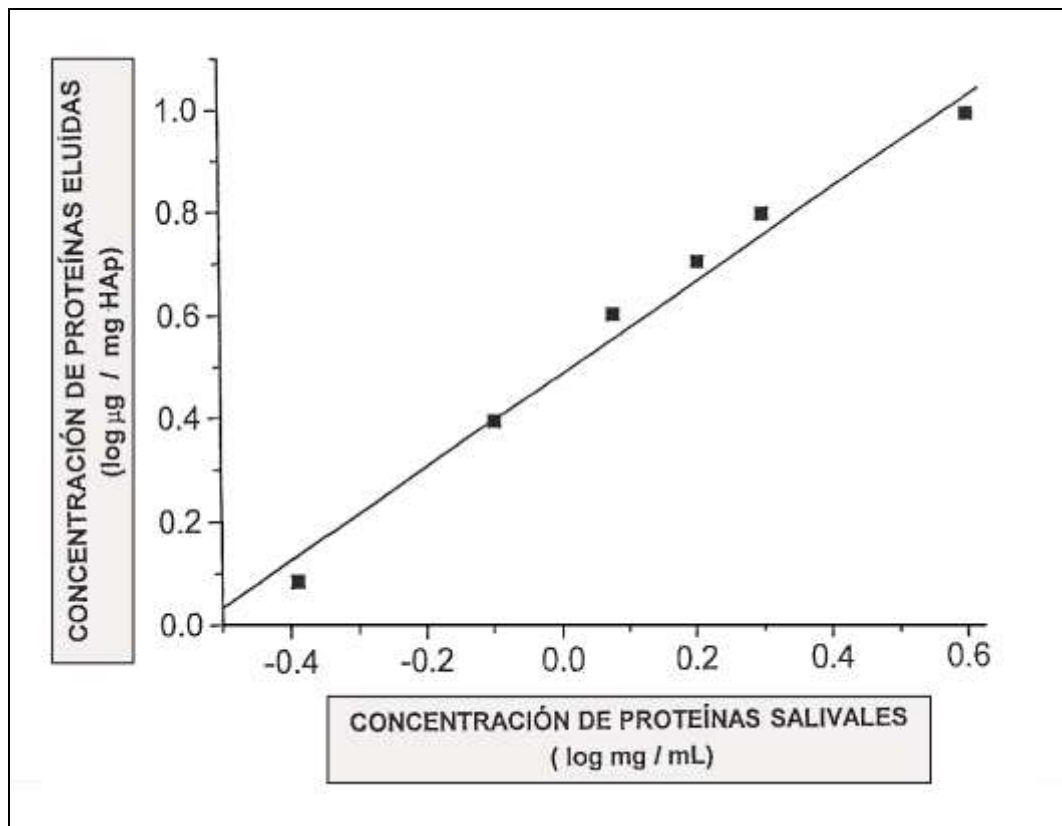
La representación gráfica de la fracción de proteínas adsorbidas por unidad de masa del adsorbente en función de la concentración de proteínas corresponde a una curva de tipo exponencial (Figura 4). La primera parte de la curva evidencia una relación lineal entre la cantidad de proteínas incubadas y la cantidad de PA resultante. En su parte final, la linealidad tiende a desaparecer a medida que la disponibilidad de proteínas se hace muy alta.

**FIGURA 4. CANTIDAD DE PROTEÍNAS DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA FORMADA *IN VITRO* POR UNIDAD DE MASA DEL ADSORBENTE, EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SALIVALES (n=5).**



La derivación logarítmica de la curva anterior da como resultado una recta casi perfecta (Figura 5).

**FIGURA 5. REPRESENTACIÓN LOGARÍTMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA FORMADA *IN VITRO* POR UNIDAD DE MASA DEL ADSORBENTE, EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SALIVALES.**



Los datos precedentes y sus correspondientes representaciones gráficas, sugieren que la retención de proteínas a la HAp y por lo tanto la formación de PA se ajustan adecuadamente a la isoterma de adsorción de Langmuir, representando un fenómeno superficial en el que intervienen fundamentalmente fuerzas de adsorción.

La incorporación de proteínas del Suero Sanguíneo Humano ( SSH ) a la SM produjo un aumento del contenido proteico de los eluatos bastante proporcional a la oferta de proteínas en la mezcla de incubación, aunque a concentraciones altas se evidenció pérdida de la linealidad (Tabla 2 ).

**TABLA 2. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA *IN VITRO* SEGÚN DISPONIBILIDAD DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y SALIVALES (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

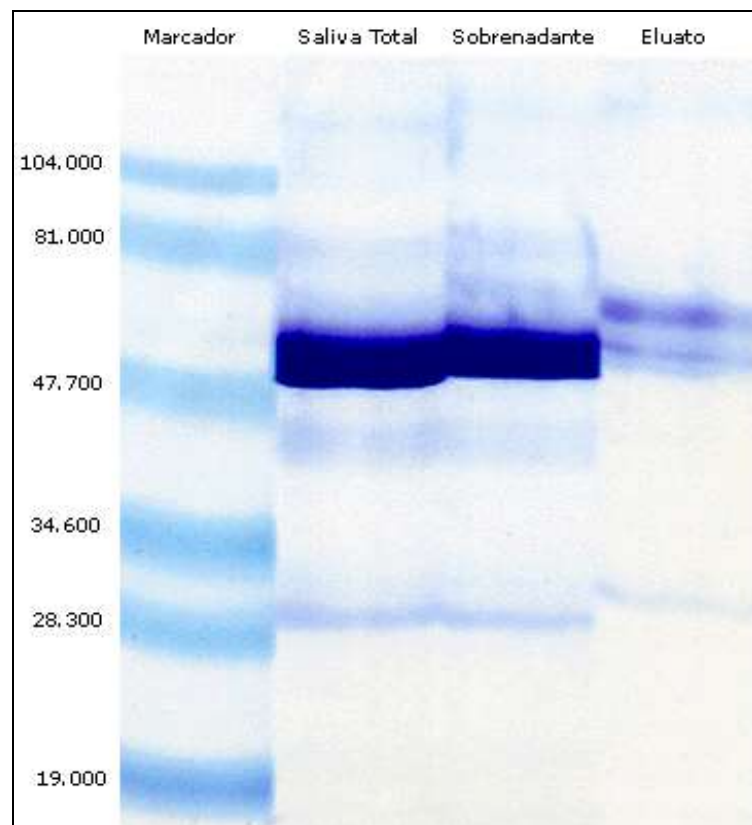
Proteínas Incubadas (mg)	Proteínas en PA ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
2,5*	6,01 $\pm$ 0,14
3,0	7,45 $\pm$ 0,23
3,5	8,22 $\pm$ 0,17
4,5	10,11 $\pm$ 0,25
6,5	13,43 $\pm$ 0,22

( r = 0,938; p<0,0002)

\* Corresponde a SM sola, sin agregado de SSH, mientras que los demás grupos corresponden a SM a la que se adicionó diferentes cantidades de SSH.

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), las proteínas de SM, las del sobrenadante de incubación con HAp y las del eluato se separan en tres grupos de bandas a las que según su movilidad denominamos **R**, **M** y **L** (movilidad rápida, media y lenta, respectivamente). El peso molecular de estas fracciones es de aproximadamente 29-31 kD para las bandas de movilidad rápida, 40-46 kD para las de movilidad media y 55-80 kD para las lentas (Figura 6 ).

**FIGURA 6. TRAZADO ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE LA SALIVA TOTAL, SOBRENADANTE DE INCUBACIÓN Y ELUATO (PELÍCULA ADQUIRIDA).**



La cantidad relativa de las fracciones proteicas que integran los eluatos difiere francamente de los de saliva total y sobrenadante de incubación (Tabla 3). Estos resultados son concordantes con los antecedentes teóricos de la formación de la PA, ya que solamente una fracción de las proteínas salivales logra adsorberse a la HAp.

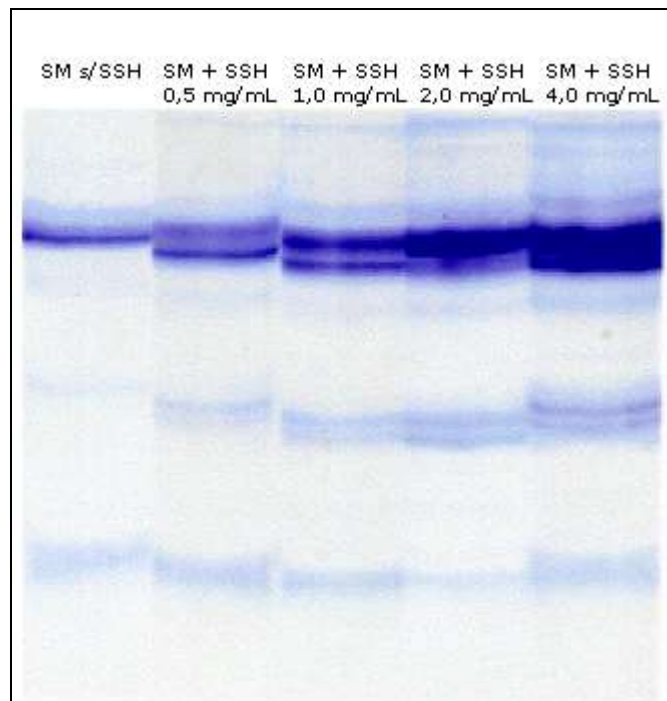
**TABLA 3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES OBTENIDAS DE LAS PROTEÍNAS DE SALIVA TOTAL, SOBRENADANTE DE INCUBACIÓN Y ELUATO SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS (media aritmética, en porcentaje; n = 5).**

<b>Peso Molecular</b>	<b>Saliva Total</b>	<b>Sobrenadante</b>	<b>Eluato</b>
Bandas de movilidad LENTA 55-80 kD	68,1	66,6	59,7
Bandas de movilidad MEDIA 40-46 kD	20,2	20,0	12,6
Bandas de movilidad RÁPIDA 29-31 kD	11,7	13,4	27,7



La incorporación de suero sanguíneo humano (SSH) a la SM (SM + SSH) produjo un cambio cuali-cuantitativo en el perfil de las proteínas adsorbidas. En el trazado electroforético aparecieron nuevas fracciones proteicas provenientes del SSH, algunas de las cuales tenían una velocidad de migración igual o semejante a la de las especies propias de la PA formada a partir de la SM (Figura 7).

**FIGURA 7. TRAZADO ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA FORMADA *IN VITRO* CON SALIVA MIXTA (SM) Y SALIVA MÁS SUERO SANGUÍNEO HUMANO [SM + SSH].**



- **Efecto del pH.** La formación de PA resultó dependiente del pH (Tabla 4). La máxima retención de proteínas y glucoproteínas se observó a pH 6,0, un valor muy próximo al necesario para que comience la disolución de la HAp. (pH crítico de HAp  $\cong$  5,5).

**TABLA 4. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, SEGÚN pH DE LA SALIVA. (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

pH salival	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)
6,0	$6,93 \pm 0,16$	$944,7 \pm 41$
6,4 *	$6,03 \pm 0,09$	$909,3 \pm 27$
6,8	$5,60 \pm 0,11$	$864,6 \pm 33$
7,2	$5,01 \pm 0,08$	$777,4 \pm 45$
7,6	$4,28 \pm 0,10$	$689,0 \pm 29$

\* Corresponde al pH de la SM original

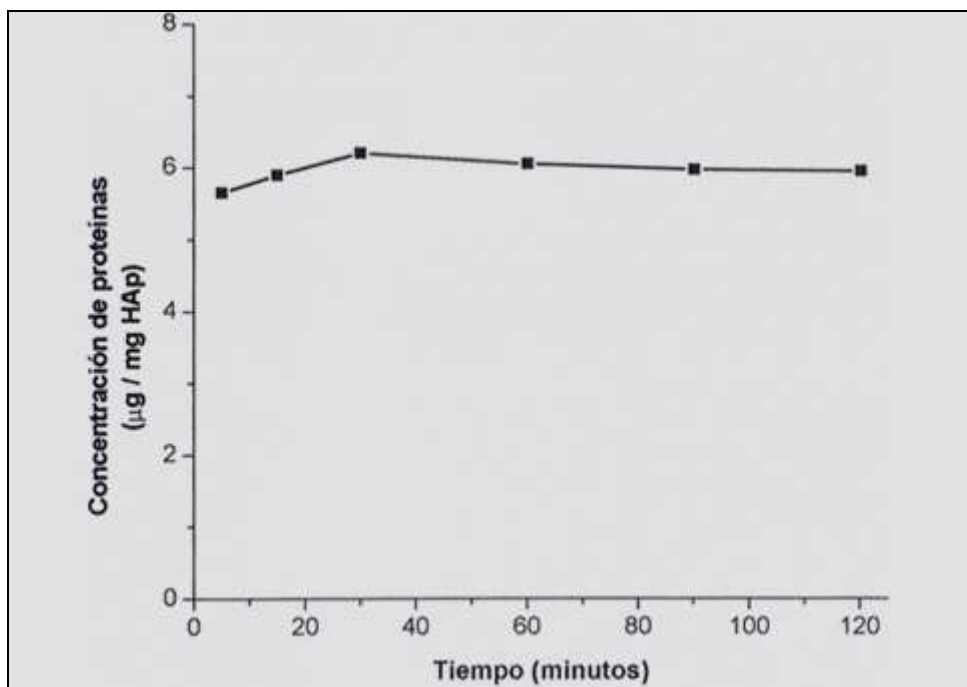
□ **Efecto de la temperatura.** En el rango estudiado (24°C a 43°C), la temperatura de incubación influyó sobre la formación de PA, observándose una reducción en la cantidad de proteínas adsorbidas a la HAp a medida que la temperatura se incrementaba, la cual alcanzó significación estadística ( $p < 0,05$ ) a partir de 38°C. La adsorción de proteínas fue máxima a 24°C, mientras que la retención de glucoproteínas resultó mayor a la temperatura de 34°C (Tabla 5).

**TABLA 5. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, SEGÚN TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Temperatura (° C)	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)
24	6,56 $\pm$ 0,14	789,2 $\pm$ 40
28	6,41 $\pm$ 0,12	863,3 $\pm$ 31
34	6,27 $\pm$ 0,07	955,0 $\pm$ 24
38	6,05 $\pm$ 0,10	901,7 $\pm$ 37
43	5,70 $\pm$ 0,08	702,8 $\pm$ 26

□ **Efecto del tiempo de incubación.** Como muestra la Figura 8, la cantidad de proteínas adsorbidas en función del tiempo estuvo moderadamente influenciada por el tiempo de incubación. A los 5 min. estaba fijada a la HAp alrededor del 90% de la cantidad máxima de proteínas que pueden ser retenidas por el adsorbente, fenómeno que ocurrió a los 30 min. de iniciado el ensayo. Las diferencias en la adsorción de proteínas en los distintos tiempos no alcanzaron significación estadística.

**FIGURA 8. CANTIDAD DE PROTEÍNAS POR UNIDAD DE MASA DEL ADSORBENTE DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA FORMADA *IN VITRO*, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN (media aritmética; n = 5).**



□ **Efecto del agregado-sustracción de iones.** La adición de calcio iónico, no así de iones magnesio ó cobre, incrementó la adsorción de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa a la HAp. Los iones fosfato produjeron un efecto contrario sobre la adsorción de proteínas, sin afectar significativamente la retención de glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa (Tabla 6).

**TABLA 6. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, SEGÚN CONCENTRACIÓN DE IONES SELECCIONADOS (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
SM control*	6,20 $\pm$ 0,13	918,4 $\pm$ 50	1,024 $\pm$ 0,016
SM + Ca <sup>++</sup> 6 mM	10,27 $\pm$ 0,21**	1,027,7 $\pm$ 42***	1,133 $\pm$ 0,027***
SM + Mg <sup>++</sup> 0,4 mM	6,11 $\pm$ 0,17	901,2 $\pm$ 33	1,016 $\pm$ 0,022
SM + Cu <sup>++</sup> 8 $\mu\text{M}$	6,24 $\pm$ 0,12	916,6 $\pm$ 29	1,037 $\pm$ 0,014
SM + Fosfato 12 mM	5,18 $\pm$ 0,08***	904,5 $\pm$ 36	0,934 $\pm$ 0,030

\*Corresponde a SM sola, sin el agregado de iones. Los restantes grupos corresponden a SM con el agregado del ión seleccionado.

\*\* p < 0,0001

\*\*\* p < 0,01

La incorporación al sistema de ensayo de cantidades crecientes de calcio iónico hasta alcanzar una concentración final de 3 a 12 M incrementó en forma proporcional la retención de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa. (Tabla 7).

**TABLA 7. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA SEGÚN CONCENTRACIÓN DE CALCIO IÓNICO AGREGADO AL SISTEMA (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas** ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas*** ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa**** ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
SM control*	6,16 $\pm$ 0,06	899,8 $\pm$ 24	1,044 $\pm$ 0,027
SM Ca <sup>++</sup> 3 mM	8,02 $\pm$ 0,22	945,9 $\pm$ 31	1,141 $\pm$ 0,019
SM Ca <sup>++</sup> 6 mM	10,04 $\pm$ 0,18	1,018,5 $\pm$ 20	1,266 $\pm$ 0,030
SM Ca <sup>++</sup> 12 mM	16,12 $\pm$ 0,27	1,862,2 $\pm$ 39	1,707 $\pm$ 0,020

\*Corresponde a SM sola, sin el agregado de iones calcio. Los restantes grupos corresponden a SM con el agregado de diferentes cantidades de calcio iónico.

\*\* r = 0,888 ; p < 0,005.

\*\*\* r = 0,811 ; p < 0,02.

\*\*\*\* r = 0,77 ; p < 0,02.

Por el contrario, la eliminación de iones calcio de la SM mediante la adición de oxalato de amonio hasta alcanzar una concentración aproximadamente equivalente a la del catión (3 mM), redujo de manera importante la retención de proteínas (85%),  $\alpha$ -amilasa (75%) y glucoproteínas (20%) por parte de la HAp (Tabla 8).

**TABLA 8. EFECTO DE LA SUSTRACCIÓN DE CALCIO IÓNICO SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
Control*	6,30 $\pm$ 0,17	907,0 $\pm$ 27	1,019 $\pm$ 0,022
SM+Oxalato de amonio	0,94 $\pm$ 0,22**	721,6 $\pm$ 23***	0,256 $\pm$ 0,018****

\* Corresponde a SM original, sin el agregado de oxalato de amonio. La restante muestra corresponde a SM original con el agregado de oxalato de amonio.

\*\* p < 0,0001

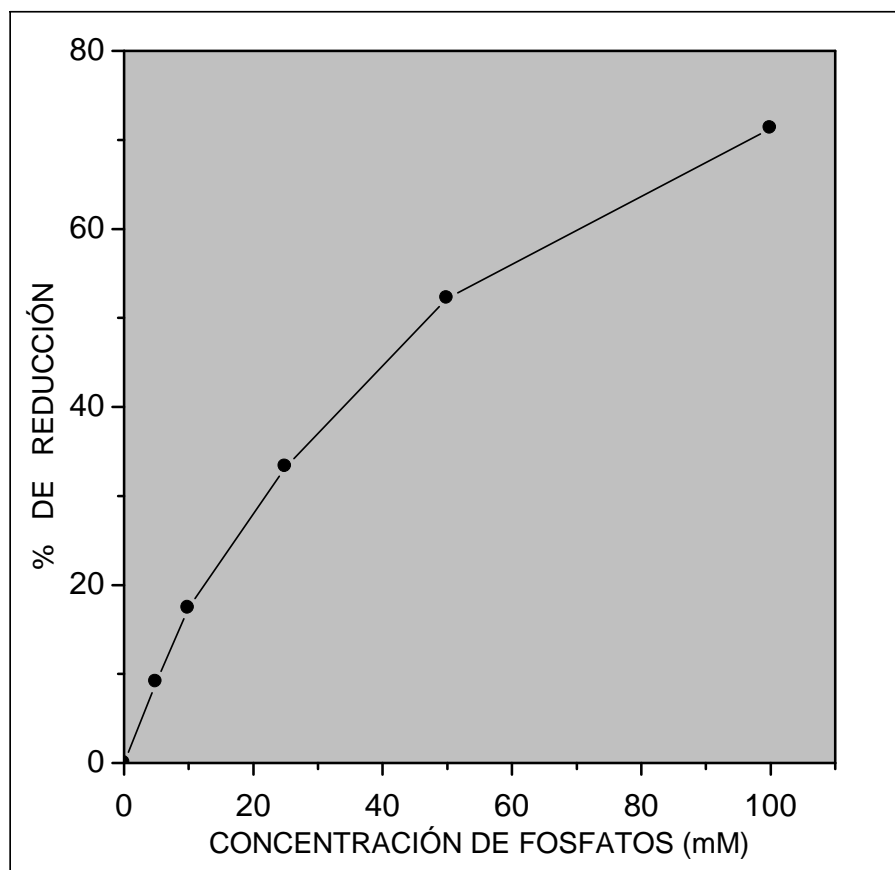
\*\*\* p < 0,01

\*\*\*\* p < 0,0002

Una reducción de similar magnitud se logró tratando la SM con oxalato de amonio 2% previa a la incubación con HAp (datos no tabulados).

La adición de buffer de fosfatos (pH 7,0) al sistema antes de producir la incubación redujo significativamente la retención de proteínas por parte de la HAp. En el rango ensayado (5-100 mM), la reducción en la formación de PA resultó casi proporcional a la concentración de fosfato (Figura 9).

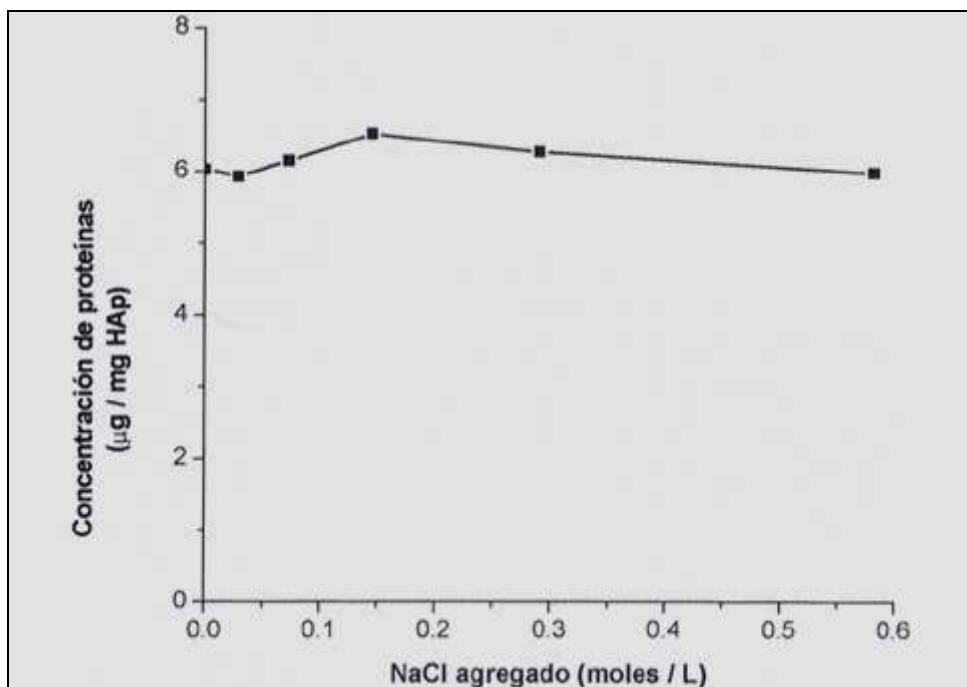
**FIGURA 9. EFECTO DEL AGREGADO DE FOSFATO pH 7,0 SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (en porcentaje; n = 5).**





□ **Efecto de la fuerza iónica.** La fuerza iónica de la SM tuvo muy poca influencia en la generación de PA artificial. La saliva deionizada produjo alrededor del 92% de la máxima cantidad de PA formada, lo cual ocurrió a la concentración de 0,145 M de NaCl. Al aumentar la concentración salina se observó una tendencia decreciente en la producción del integumento. (Figura 10).

**FIGURA 10. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA DEL SISTEMA SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética; n = 5)**



□ **Efecto del agregado de inhibidores–removedores de placa bacteriana.** La incorporación de sustancias inhibidoras-removedoras de placa bacteriana al sistema de incubación hasta alcanzar concentraciones finales equivalentes a las empleadas con fines preventivos o terapéuticos produjo dispares resultados. Mientras que clorhexidina (CLX) 0,12% y 0,24%; NaF 0,10% y hexetidina (HEX) 0,10% no afectaron la formación

de PA, xilitol (XIL) 10% sólo o asociado a NaF 0,10% redujo la formación de PA. Estos efectos fueron más intensos respecto a la adsorción de glucoproteínas (Tabla 9).

**TABLA 9. EFECTO DE INHIBIDORES-REMOVEDORES DE PLACA BACTERIANA SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
Control*	6,20 $\pm$ 0,11	924,0 $\pm$ 20	1,037 $\pm$ 0,022
CLX 0,12%	6,23 $\pm$ 0,15	916,9 $\pm$ 18	1,050 $\pm$ 0,016
CLX 0,24%	6,18 $\pm$ 0,09	909,7 $\pm$ 22	1,026 $\pm$ 0,028
CLX 0,12% + NaF 0,10%	6,19 $\pm$ 0,16	911,3 $\pm$ 10	1,021 $\pm$ 0,031
NaF 0,10%	6,10 $\pm$ 0,18	921,6 $\pm$ 24	1,039 $\pm$ 0,024
HEX 0,10%	6,26 $\pm$ 0,13	924,4 $\pm$ 25	1,041 $\pm$ 0,028
XIL 10%	4,03 $\pm$ 0,18**	631,3 $\pm$ 16**	0,666 $\pm$ 0,029**
XIL 10% + NaF 0,10%	2,60 $\pm$ 0,13**	606,1 $\pm$ 20**	0,622 $\pm$ 0,025**

\* Corresponde a SM original sin el agregado de Inhibidores-removedores de placa

\*\* p < 0,001

La incorporación al sistema de ensayo de sorbitol o manitol, produjo una reducción similar a la ocasionada por xilitol en la retención de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa (Tabla 10).

**TABLA 10. EFECTO DE XILITOL Y OTROS POLIALCOHOLES SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
Control*	6,06 $\pm$ 0,13	910,6 $\pm$ 25	1,044 $\pm$ 0,020
Xilitol 10%	4,24 $\pm$ 0,10**	639,2 $\pm$ 18**	0,651 $\pm$ 0,026**
Sorbitol 10%	4,17 $\pm$ 0,18**	632,1 $\pm$ 27**	0,622 $\pm$ 0,031**
Manitol 10%	4,06 $\pm$ 0,11 **	628,5 $\pm$ 23 **	0,616 $\pm$ 0,029 **

\* Corresponde a la saliva mixta original, sin agregado de polialcoholes.

\*\*  $p < 0,005$

La reducción en la formación de película adquirida provocada por xilitol, sorbitol y manitol resultó proporcional a la concentración final del polialcohol en el sistema de incubación, tanto para proteínas como glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa. En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos con xilitol.

**TABLA 11. EFECTO DEL XILITOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

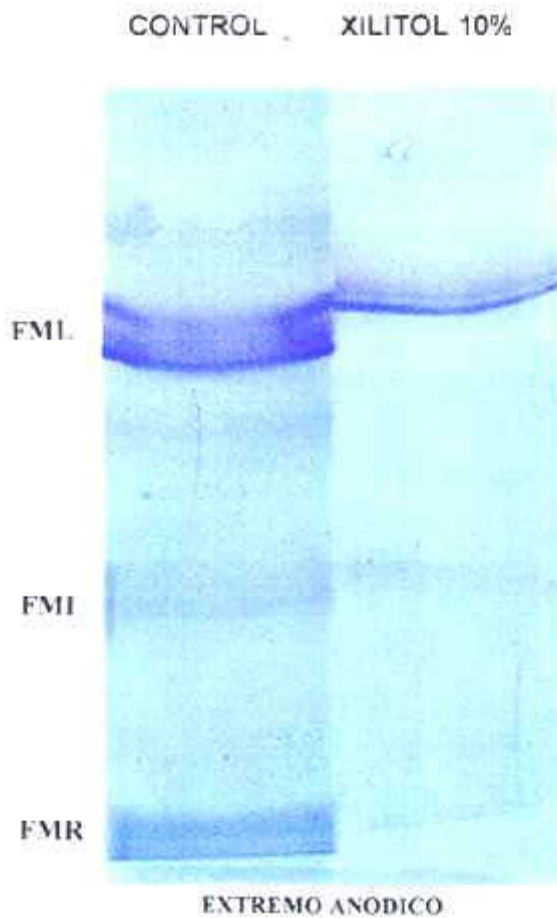
Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
Control*	6,20 $\pm$ 0,17	928,1 $\pm$ 28	1,072 $\pm$ 0,033
XIL 1%	5,94 $\pm$ 0,11	898,6 $\pm$ 21	1,017 $\pm$ 0,017
XIL 2%	5,49 $\pm$ 0,15	841,7 $\pm$ 19	0,936 $\pm$ 0,041
XIL 5%	5,25 $\pm$ 0,14	757,3 $\pm$ 34	0,818 $\pm$ 0,022
XIL 10%	4,31 $\pm$ 0,10	643,9 $\pm$ 20	0,658 $\pm$ 0,029

\*Corresponde a la saliva mixta original, sin el agregado de xilitol.

$$r = 0,92 ; p < 0,0002$$

El fraccionamiento electroforético en capa delgada de poliacrilamida mostró que las fracciones proteicas de la PA que disminuyeron en mayor grado por el agregado de XIL fueron las de migración rápida (Figura 11), cuya proporción se redujo más de 10 veces respecto al control cuando la concentración de XIL alcanzó el 10% (Tabla 12).

**FIGURA 11. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, FORMADA EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE XILITOL 10%.**



El volumen de siembra de cada uno de los eluatos de película adquirida fue de 80 microlitros. La migración electroforética se realizó hasta que el frente de colorante marcador (azul de bromofenol) llegó hasta 1 cm del extremo anódico del gel

**FML** = Fracciones de Migración Lenta.

**FMI** = Fracciones de Migración Intermedia.

**FMR** = Fracciones de Migración Rápida.

**TABLA 12. FRACCIONES PROTEICAS DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, FORMADA EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE XILITOL (media aritmética del porcentaje  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Fracciones	Migración Lenta	Migración Intermedia	Migración Rápida
Control *	61,2 $\pm$ 2,4	11,1 $\pm$ 1,7	27,8 $\pm$ 2,9
XIL 1%	61,9 $\pm$ 1,8	11,3 $\pm$ 0,9	26,8 $\pm$ 1,7
XIL 2%	63,9 $\pm$ 2,2	12,1 $\pm$ 1,5	24,0 $\pm$ 1,2
XIL 5%	67,2 $\pm$ 2,7	15,1 $\pm$ 1,1	17,7 $\pm$ 1,7
XIL 10%	70,9 $\pm$ 2,0	27,0 $\pm$ 2,3	2,1 $\pm$ 1,0

\*Corresponde a la saliva mixta original, sin el agregado de Xilitol.

La combinación de Xil 10% con NaF ( 0,02%, 0,05% y 0,10% ) y con fosfatos ( 25mM y 50 mM ) produjo una mayor reducción en la formación de PA que cuando el polialcohol fue utilizado solo. El agregado de calcio iónico al sistema (3; 6 y 12 mM) anuló en parte el efecto reductor producido por XIL 10 % (Tabla 13).

**TABLA 13. EFECTO DEL XILITOL COMBINADO CON IONES FLUORURO, FOSFATO O CALCIO, SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Porcentaje de reducción
Control *	6,22 + 0,11	0,0
XIL 10%	4,02 + 0,22	35,5
XIL 10% + F <sup>-</sup> 0,02%	2,95 + 0,18	52,6
XIL 10% + F <sup>-</sup> 0,05%	2,62 + 0,20	57,9
XIL 10% + F <sup>-</sup> 0,1%	2,40 + 0,14	61,4
XIL 10% + Fosfato 25mM	3,25 + 0,16	47,7
XIL 10% + Fosfato 50mM	2,52 + 0,17	59,5
XIL 10% + Calcio 3mM	6,25 + 0,18	+0,5
XIL 10% + Calcio 6mM	7,28 + 0,26	+17,0
XIL 10% + Calcio 12mM	9,57 + 0,30	+53,9

\*Corresponde a saliva mixta, sin agregado de xilitol ni de iones.

A diferencia de lo que ocurre con los polialcoholes, la incorporación de monosacáridos (glucosa, galactosa y fructosa) o disacáridos (sacarosa, lactosa y maltosa) no modifica significativamente la formación de PA artificial, si bien en el caso de los monosacáridos ensayados se observa una cierta tendencia a producir una reducción en la adsorción de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa a la HAp respecto al control (Tabla 14).

**TABLA 14 . EFECTO DE MONOSACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS SELECCIONADOS SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
Control*	6,11 $\pm$ 0,15	920,4 $\pm$ 22	1,066 $\pm$ 0,021
Glucosa	5,74 $\pm$ 0,17	876,7 $\pm$ 18	1,001 $\pm$ 0,013
Galactosa	5,65 $\pm$ 0,14	853,1 $\pm$ 21	1,003 $\pm$ 0,025
Fructosa	5,77 $\pm$ 0,18	866,4 $\pm$ 25	1,010 $\pm$ 0,029
Sacarosa	6,02 $\pm$ 0,12	930,0 $\pm$ 18	1,077 $\pm$ 0,031
Lactosa	6,25 $\pm$ 0,16	933,4 $\pm$ 23	1,060 $\pm$ 0,021
Maltosa	6,29 $\pm$ 0,13	926,7 $\pm$ 16	1,071 $\pm$ 0,018

\*Corresponde a la saliva mixta original, sin agregado de azúcares.



- **Formación de placa bacteriana.** Como muestra la Tabla 15, la producción de PA formada *in vitro* sobre bloques (especímenes) dentarios y su posterior colonización por *Streptococcus mutans* (St M) o flora aeróbica total de saliva (FATS) se redujo de manera significativa cuando dicho integumento fue generado a partir de un sistema que contenía Xil 10%.

**TABLA 15. EFECTO DEL XILITOL SOBRE LA FORMACIÓN DE PLACA BACTERIANA A PARTIR DE PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL, EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE XILITOL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

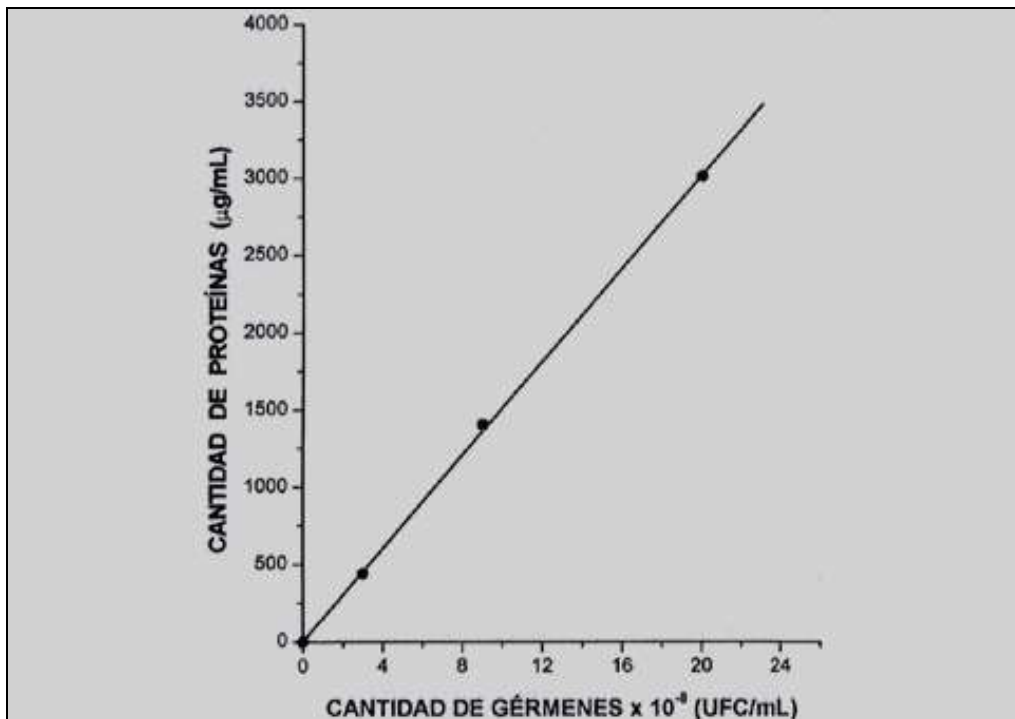
Tratamiento	ng de proteína/mm <sup>2</sup> de diente	
	Película Adquirida	Placa Bacteriana
PA Control* + St M ó FATS	387,5 $\pm$ 28	992,6 $\pm$ 29
PA Xil 10% + St M	245,2 $\pm$ 16**	612,1 $\pm$ 37**
PA XIL 10% + FATS	241,9 $\pm$ 19**	630,3 $\pm$ 30**

\*Corresponde a la película adquirida formada con saliva mixta original, sin el agregado de xilitol.

\*\* p < 0,002

Por cuanto los resultados sobre formación de PB se expresaron como cantidad de proteínas por mm<sup>2</sup> de diente, conforme a lo recomendado por Distler et al (103), se realizaron ensayos a los fines de comprobar la existencia de correlación entre el contenido de dichas macromoléculas y la cantidad de gérmenes presentes en el integumento. A esos fines, preparaciones con diferentes cantidades de gérmenes (UFC/mL) provenientes de cultivos de flora aeróbica total de saliva fueron analizadas en su contenido proteico. Los datos de la Figura 12 muestran una correlación estrictamente proporcional ( $r = 0,94$ ;  $p = 0,0001$ ) entre ambas variables.

**FIGURA 12. CORRELACIÓN ENTRE CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y CANTIDAD DE GÉRMENES (media aritmética; n = 5).**



## 2- ESTUDIOS *IN SITU*.

□ **Formación de película adquirida.** Se realizaron dos tipos de ensayos, según que los voluntarios hubieran recibido tratamiento mediante enjuagatorios bucales o consumo de gomas de mascar. La aplicación de un enjuagatorio bucal durante 1 min. de una solución al 10% de la mezcla en partes iguales de xilitol, sorbitol y manitol no modificó significativamente ( $p > 0,05$ ) el contenido de proteínas, glucoproteínas,  $\alpha$ -amilasa y ácido siálico de la PA formada en condiciones similares a las fisiológicas, respecto a los controles que realizaron el enjuague bucal con agua (Tabla 16).

**TABLA 16. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE ENJUAGATORIOS BUCALES QUE CONTENÍAN UNA MEZCLA DE XILITOL, SORBITOL Y MANITOL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5) .**

<b>Maxilar superior</b>	<b>Control</b>	<b>Experimental</b>
Proteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	310,6 $\pm$ 18,0	301,2 $\pm$ 13,0
Glucoproteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	40,3 $\pm$ 6,0	37,9 $\pm$ 4,0
$\alpha$ -Amilasa ( $\mu$ g /mm <sup>2</sup> )	3,2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,3
Ácido Siálico (ng/mm <sup>2</sup> )	9,6 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 0,6
<b>Maxilar inferior</b>	<b>Control</b>	<b>Experimental</b>
Proteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	298,8 $\pm$ 12,0	307,5 $\pm$ 15,0
Glucoproteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	38,8 $\pm$ 4,0	38,1 $\pm$ 3,0
$\alpha$ -Amilasa ( $\mu$ g /mm <sup>2</sup> )	3,4 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,2
Ácido Siálico (ng/mm <sup>2</sup> )	9,8 $\pm$ 0,45	9,6 $\pm$ 0,5

Por el contrario, el consumo de gomas de mascar (1/hora) elaboradas en base a una mezcla de los tres polialcoholes ocasionó una reducción promedio del orden del 30% en la cantidad de las especies químicas analizadas que se encontraban retenidas en el maxilar superior, y del 40% en las que estuvieron soportadas en el maxilar inferior (Tabla 17).

**TABLA 17. FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA DESPUÉS DEL CONSUMO DE GOMAS DE MASCAR QUE CONTENÍAN UNA MEZCLA DE XILITOL, SORBITOL Y MANITOL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

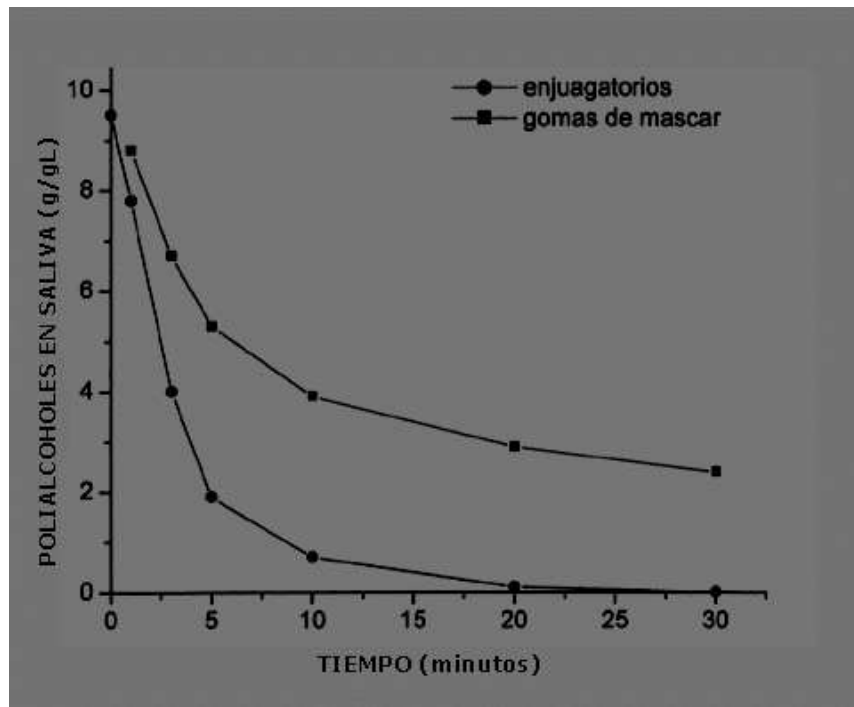
<b>Maxilar superior</b>	<b>Control</b>	<b>Experimental</b>
Proteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	323,8 $\pm$ 10,0	242,1 $\pm$ 15,0*
Glucoproteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	41,4 $\pm$ 3,0	27,7 $\pm$ 3,0*
$\alpha$ -Amilasa ( $\mu$ g /mm <sup>2</sup> )	3,1 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,2*
Ácido Siálico (ng/mm <sup>2</sup> )	9,5 $\pm$ 0,7	7,0 $\pm$ 0,5*
<b>Maxilar inferior</b>	<b>Control</b>	<b>Experimental</b>
Proteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	308,8 $\pm$ 14,0	220,0 $\pm$ 11,0*
Glucoproteínas (ng/mm <sup>2</sup> )	41,7 $\pm$ 4,0	25,6 $\pm$ 2,0*
$\alpha$ -Amilasa ( $\mu$ g /mm <sup>2</sup> )	3,3 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,4*
Ácido Siálico (ng/mm <sup>2</sup> )	9,0 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,3*

\* p < 0,001

Para explicar el dispar comportamiento de los polialcoholes aplicados como enjuagatorios o gomas de mascar se realizaron ensayos para medir la velocidad de depuración bucal de estos compuestos según estuvieran contenidos en uno u otro producto. Con ese propósito fueron

efectuadas mediciones secuenciales de la mezcla de polialcoholes contenidos en saliva después de cada tratamiento. Como muestra la Figura 13, en razón de su baja sustentividad los polialcoholes aplicados en forma de enjuagatorios se depuran muy rápidamente de la cavidad bucal, alcanzando una concentración salival cercana al 2% a los 5 minutos siguientes a la realización del enjuague, mientras que cuando se emplearon como gomas de mascar su concentración en ese tiempo superó el 5%.

**FIGURA 13. VELOCIDAD DE DEPURACIÓN BUCAL DE LA MEZCLA DE XILITOL, SORBITOL Y MANITOL (\*) APLICADA EN FORMA DE ENJUAGATORIOS O DE GOMAS DE MASCAR (media aritmética; n = 5).**



**Curva de depuración de polialcoholes**

(\*) El contenido de polialcoholes salivales después de la aplicación de cada tratamiento fue determinado mediante la reacción de la antrona, previa separación de las glucoproteínas de la saliva con ácido tricloroacético al 10%.

- **Formación de placa bacteriana.** La cantidad de PB formada a partir de PA resultó muy similar ( $p > 0,05$ ) ya sea cuando los enjuagatorios se realizaron con agua o con la solución mezcla de los tres polialcoholes, en tanto que el tratamiento con gomas de mascar edulcoradas con dichos compuestos produjo una reducción del orden del 30% en ambos maxilares. (Tabla 18 ).

**TABLA 18. FORMACIÓN DE PLACA BACTERIANA A PARTIR DE PELÍCULA ADQUIRIDA OBTENIDA EN PRESENCIA DE POLIALCOHOLES APLICADOS COMO ENJUAGATORIOS Y GOMAS DE MASCAR (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar;  $n = 5$ ).**

	(nanogramos proteínas/ mm <sup>2</sup> )	
Tratamiento	Control	Experimental
<b>Enjuagatorios</b>		
Maxilar superior	897 $\pm$ 26	886 $\pm$ 31
Maxilar inferior	872 $\pm$ 19	868 $\pm$ 26
<b>Gomas de Mascar</b>		
Maxilar superior	902 $\pm$ 33	620 $\pm$ 20*
Maxilar inferior	878 $\pm$ 21	602 $\pm$ 29*

\* $p < 0,002$

□ **Estudio del mecanismo de acción del Xilitol y demás polialcoholes.**

La Tabla 19 muestra que el tratamiento previo de la HAp con solución de Xil 10% no modificó en forma estadísticamente significativa la cantidad retenida por el adsorbente de ninguna de las especies químicas ensayadas. De igual modo, tampoco se produjeron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la cantidad de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa luego de lavar la PA artificial con la solución del polialcohol.

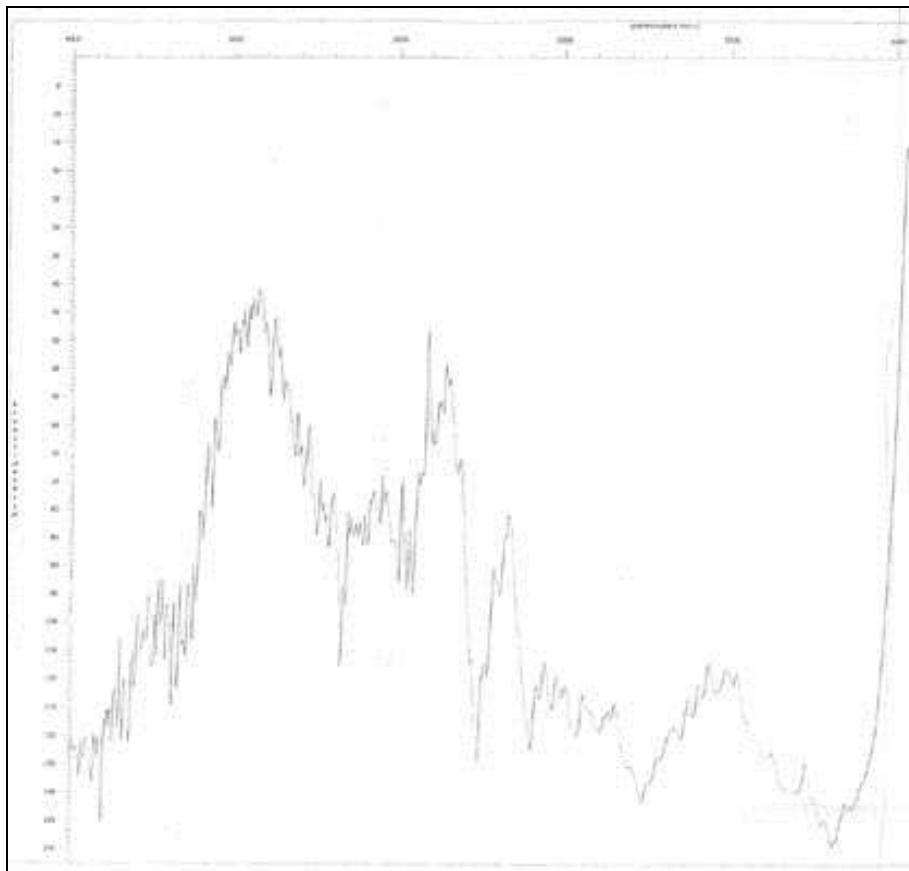
**TABLA 19. EFECTO DEL XILITOL SOBRE LA CAPACIDAD ADSORTIVA DE LA HIDROXIAPATITA Y SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA ARTIFICIAL (media aritmética  $\pm$  una desviación estándar; n = 5).**

Tratamiento	Proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)	Glucoproteínas ( $\text{ng}/\text{mg}$ HAp)	$\alpha$ -Amilasa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ HAp)
HAp lavada con agua(control)	6,23 $\pm$ 0,13	917,1 $\pm$ 19	0,961 $\pm$ 0,017
HAp lavada con Xil 10%	6,29 $\pm$ 0,18	927,6 $\pm$ 15	0,966 $\pm$ 0,029
PA lavada con agua (control)	6,09 $\pm$ 0,10	909,4 $\pm$ 16	0,945 $\pm$ 0,024
PA lavada con XIL% 10%	6,15 $\pm$ 0,16	888,2 $\pm$ 20	0,922 $\pm$ 0,015

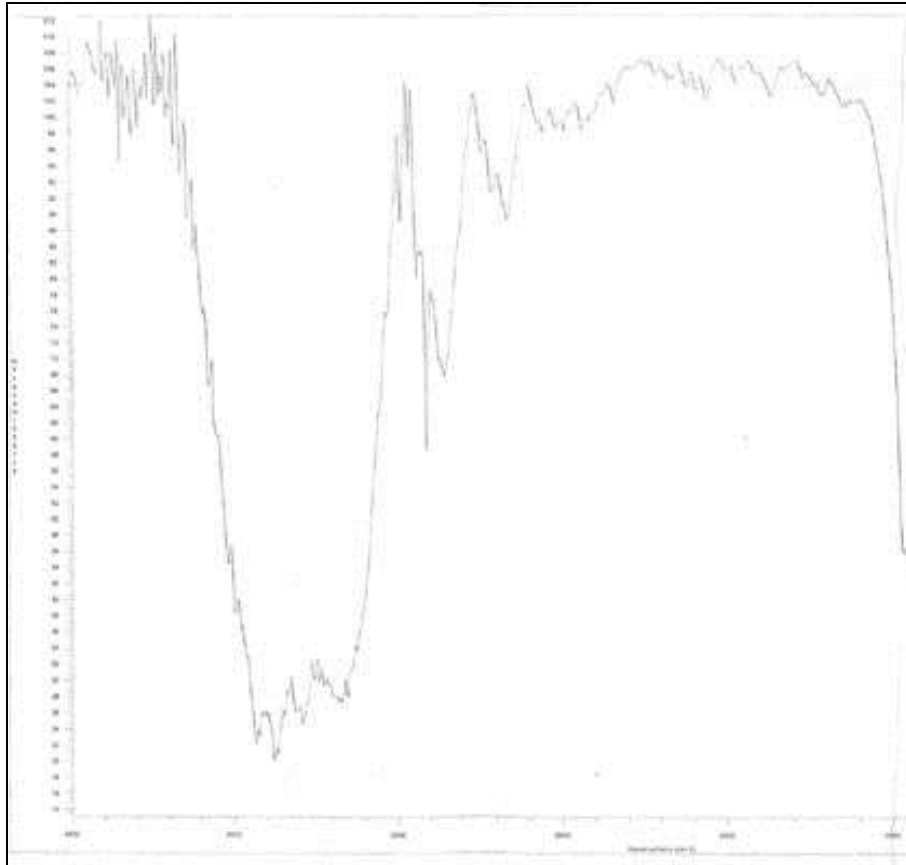
El agregado de Xil no modifica el espectro de absorción UV de la SM, lo cual podría indicar que el efecto del polialcohol no ocurre como consecuencia de una interacción con las proteínas del fluido salival (datos no presentados). La Figura 14 reproduce el espectro de absorción IR de Xil, al estado puro (A) y en presencia de iones calcio (B). Las bandas de absorción del Xil puro, localizadas en la zona de 3200-3600 nm, se desplazan hacia la zona de 2500-3200 nm cuando dicho compuesto se mezcla con iones calcio (B).

**FIGURA 14. ESPECTRO DE ABSORCIÓN INFRARROJO DE XILITOL, SÓLO (A) Y EN PRESENCIA DE IONES CALCIO (B).**

**A**





**B**

## VI. DISCUSIÓN

Se acepta en la actualidad que la formación de la película adquirida corresponde a un fenómeno de retención sobre los elementos dentarios de las proteínas y glucoproteínas provenientes de la saliva, del plasma sanguíneo, del líquido crevicular y de microorganismos bucales, donde la contribución cuantitativa es dependiente de la afinidad de cada una de esas macromoléculas por la HAp y de la disponibilidad de los sitios de adsorción en la superficie cristalina (99). Así es como las mucinas de alto peso molecular, que presentan mayor afinidad por la HAp que sus congéneres más livianos, forman parte de la PA en buena proporción, mientras que estos últimos están presentes sólo en forma de vestigios (100).

Nuestros resultados son concordantes con esos antecedentes. Desde que las proteínas procedentes de la saliva deben competir por los limitados sitios de unión existentes en la superficie de la HAp, su incorporación a la PA está condicionada por la relación entre la oferta de dichas macromoléculas y la superficie de adsorción disponible. Los datos de la Tabla 1 indican que cuando la oferta de proteínas es relativamente baja, la adsorción aumenta proporcionalmente a medida que crece la disponibilidad de moléculas del adsorbato, pero esa relación lineal tiende a perderse cuando la cantidad de proteínas presentes en el sistema se hace demasiado grande y en consecuencia se llega a la saturación del adsorbente. La representación gráfica de la fracción de proteínas retenidas por unidad de masa de adsorbente en función de la

concentración de proteínas salivales produjo una curva de tipo exponencial (Figura 4), que responde a la ecuación:

$$x/m = k [P]^{1/n}$$

donde:

$x/m$  =  $\mu\text{g}$  proteínas adsorbidas / $\text{mg}$  HAp

$k$  = constante.

$[P]$  = concentración de proteínas salivales.

$n$  = valor comprendido entre 0 y 1.

En su primera parte, la curva evidencia una relación lineal entre la cantidad de proteínas incubadas y la cantidad de PA resultante, mientras que en su parte final esta tendencia tiende a desaparecer a medida que la oferta de proteínas se hace muy alta. Por su parte, la derivación logarítmica de la curva anterior dio origen a una recta (Figura 5) que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\log x/m = \log k + 1/n \log [P]$$

Ambas representaciones gráficas se ajustan adecuadamente a lo previsto en la isoterma de Langmuir, avalando el concepto que la retención de proteínas salivales por la HAp, y por lo tanto la formación de PA, representa un fenómeno superficial en el que intervienen fundamentalmente fuerzas de adsorción.

A igual conclusión permite arribar el experimento donde se incubó HAp y una mezcla de SM y suero sanguíneo humano (SSH). La incorporación de proteínas provistas por SSH a la SM produjo un

aumento del contenido proteico de los eluatos bastante proporcional a la oferta de proteínas en la mezcla de incubación, aunque a concentraciones altas se evidenció una pérdida de la linealidad (Tabla 2).

La producción de PA es un fenómeno muy complejo, que ocurre de manera selectiva y en forma muy rápida. Si el fenómeno de adsorción no fuera de naturaleza selectiva, sería de esperar que los eluatos de PA mostraran la misma composición que la saliva total. Sin embargo, como lo muestra la Figura 6, las fracciones proteicas comprendidas en el grupo de proteínas de movilidad electroforética lenta (fracción L) y que representan especies químicas de alto peso molecular, son las que predominan en los eluatos de PA (59,7%), (Tabla 3). Estos resultados son concordantes con los datos aportados por Vassilakos et al (40) respecto a la formación del integumento *in vivo*, según los cuales parte de las proteínas contenidas en la saliva total, en especial las fracciones de alto peso molecular, pasan a integrar la PA.

De acuerdo a nuestra experiencia, a los cinco minutos de iniciada la incubación del sistema logró fijarse a la HAp alrededor del 90% de la cantidad máxima de proteínas que pueden ser retenidas por el adsorbente, fenómeno que ocurrió hacia los 30 minutos de iniciado el ensayo (Figura 8). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por Lamkin et al (15) y pueden explicarse atendiendo a que la formación de PA *in vivo* se produce en dos fases consecutivas. La primera de ellas, cuantitativamente más importante, corresponde a la retención de proteínas provenientes de la saliva sobre la HAp

adamantina. En esta fase, diversas proteínas se adsorben casi instantáneamente a la superficie del adsorbente (31). La segunda fase, correspondiente al estadio de maduración del integumento, implica diversas modificaciones fisicoquímicas y químicas de las macromoléculas adsorbidas, lo cual las habilita para fijar microorganismos del ambiente bucal, y en consecuencia, posibilita la colonización bacteriana de la PA.

El ambiente bucal está expuesto a cambios temporarios en sus condiciones físico-químicas, variaciones que se producen como consecuencia, por ejemplo, de la ingesta de alimentos o bebidas a lo largo el día. Es de suponer que tales modificaciones tienen repercusión sobre la formación de PA. Las experiencias de formación de PA bajo condiciones in vitro muestran una mayor producción cuando el pH del medio de incubación se acercó al pH crítico de la HAp ( $\text{pH} \approx 5,5$ ), esto es, al valor necesario para que comience su disolución. La Tabla 4 indica que la mayor retención de proteínas y glucoproteínas se logró a pH 6. Por cuanto una de las funciones que se le atribuyen a la PA es la de proteger al elemento dentario contra la desmineralización por sustancias ácidas (8-10,39), quizás nuestros hallazgos indiquen que esta propiedad tiene la implicancia fisiológica de prevenir la erosión dentaria.

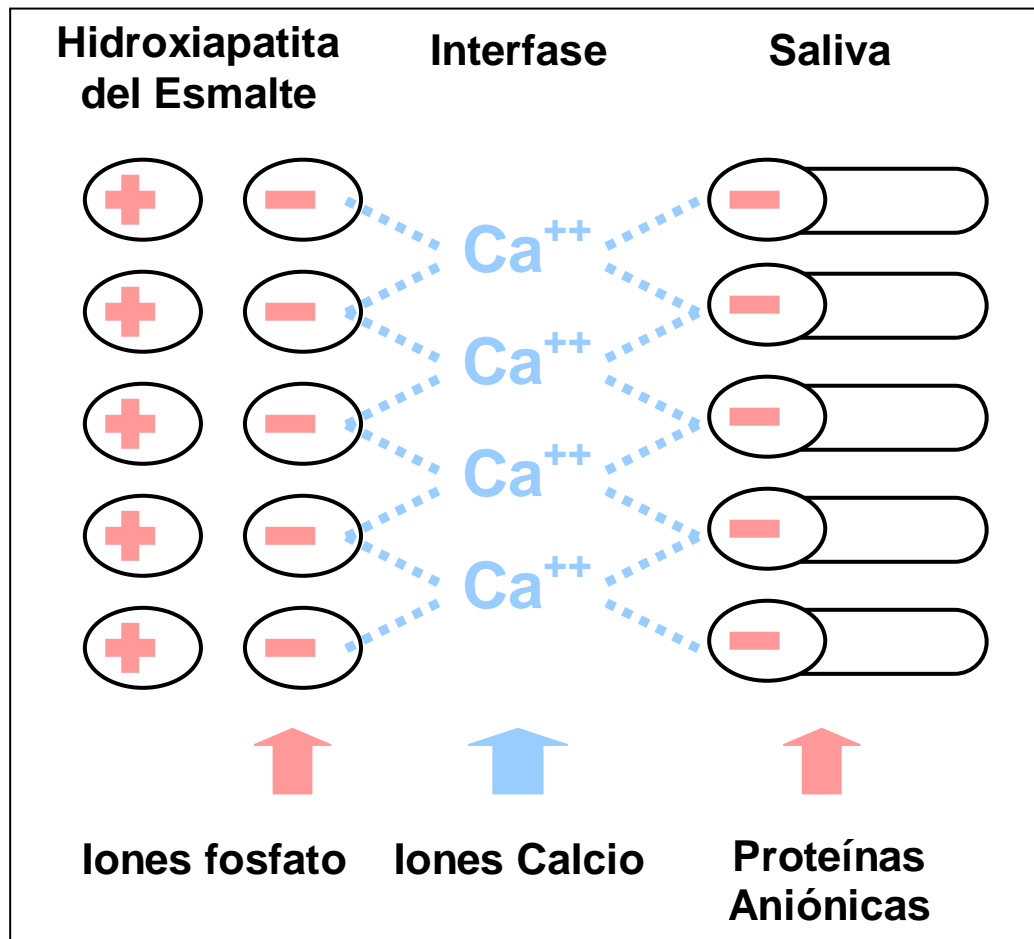
La temperatura de incubación produjo diferencias en la retención de proteínas y glucoproteínas. La Tabla 5 muestra que la retención de proteínas alcanzó el máximo a la temperatura de 24°C, disminuyendo la adsorción a medida que aumentaba la temperatura, en tanto que la máxima retención de glucoproteínas se alcanzó a los 34°C.

El agregado de calcio iónico a la SM previo a la incubación con HAp incrementó la retención de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa por el adsorbente. Este efecto favorecedor resultó proporcional a la concentración de calcio presente en el sistema de ensayo, como lo indica la Tabla 7. En cambio, la sustracción del calcio iónico mediante el agregado de oxalato de amonio produjo una reducción en la retención de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa (Tabla 8). Por el contrario, la incorporación de iones fosfato disminuyó la formación de PA, alcanzado tal reducción a más del 65% cuando la concentración de fosfato en el sistema fue de 100 mM (Figura 9). Recuérdese que con una concentración de fosfato de 200 mM se produce la remoción total de la PA.

Los efectos antagónicos producidos por los iones calcio y fosfato sobre la formación de PA tienen una coherente explicación a partir del modelo propuesto para la formación de dicho integumento (7,101). La HAp, principal componente mineral del esmalte dental, es un cristal iónico de carácter anfotérico, capaz de unirse tanto a proteínas aniónicas como catiónicas. Debido a la localización de grupos fosfato en la zona más externa de los cristales de HAp, éstos poseen una carga eléctrica negativa, de modo que para neutralizar dichas cargas son atraídas hacia la superficie del cristal cantidades equivalentes de calcio iónico presentes en la saliva. Por su parte, en el ambiente bucal existen macromoléculas orgánicas, en especial proteínas, con grupos hidrofílicos, hidrofóbicos y/o eléctricamente cargados. Como consecuencia de ello, las proteínas

aniónicas pueden establecer uniones electrostáticas con los iones calcio que están retenidos a los cristales, resultando adsorbidas a la HAp (Figura 15).

**FIGURA 15 . ESQUEMA DE FORMACIÓN DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA.**



A partir de este modelo se puede inferir que la retención de los iones calcio incorporados al sistema en la superficie externa de la HAp produce un aumento del número de receptores para la fijación de las macromoléculas, con el consiguiente incremento en la cantidad de PA formada. Por su parte, el agregado de fosfato rompe el equilibrio inestable en que se encuentra el sistema, provocando el arrastre de iones calcio

que actúan como ligandos bajo la forma de fosfato de calcio insoluble (Tabla 6).

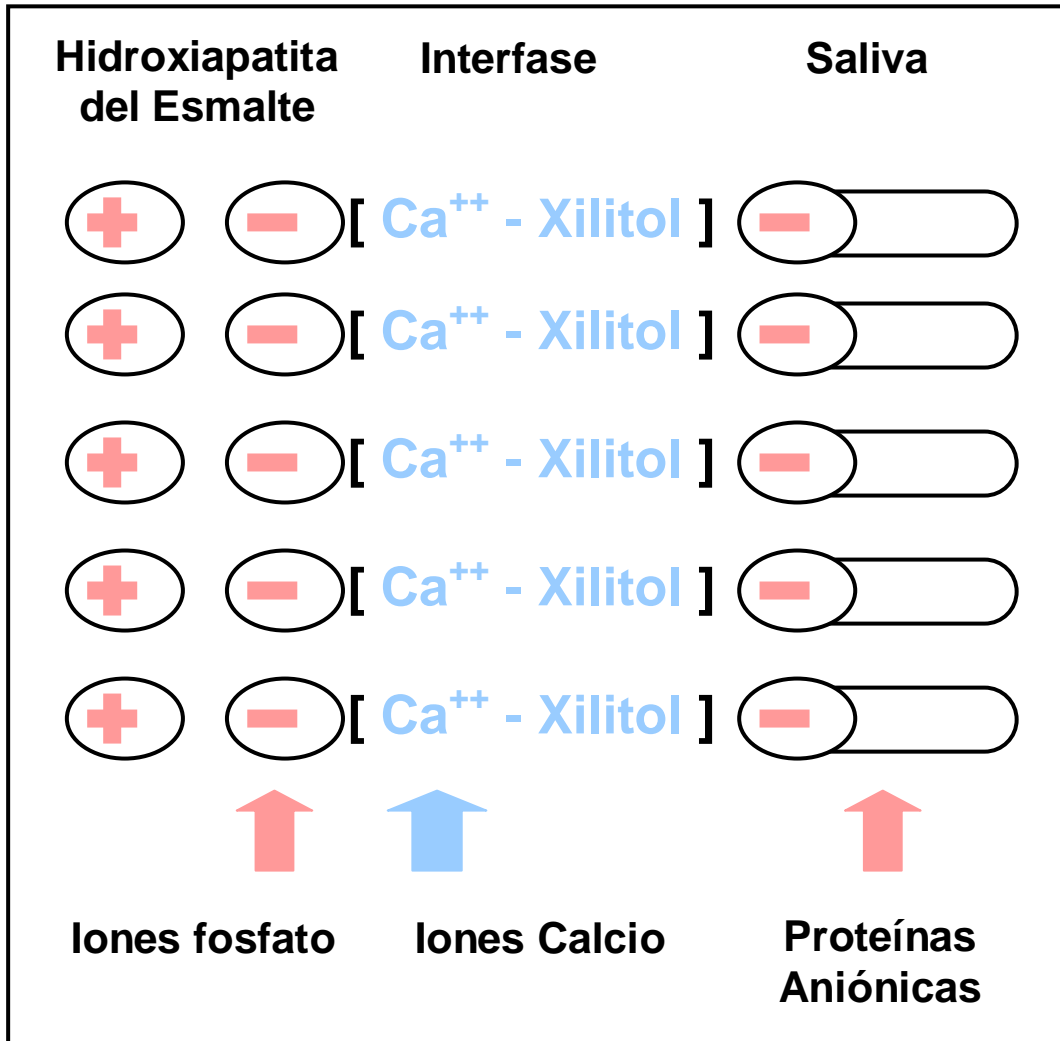
La presencia de xilitol, lo mismo que sus congéneres sorbitol y manitol, reducen la adsorción de proteínas, glucoproteínas y  $\alpha$ -amilasa a la HAp (Tabla 10), en forma proporcional a la concentración del azúcar-alcohol (Tabla 11). El agregado de un exceso de calcio iónico en el sistema de incubación que contenía xilitol tendió a revertir el efecto inhibitorio de este polialcohol.

El efecto ocasionado por los polialcoholes puede interpretarse sobre la base del mecanismo de formación de la PA. Los iones calcio representan un factor que intermedia la unión de proteínas y glucoproteínas aniónicas a la HAp. Como un exceso de este catión puede reducir los efectos inhibitorios del xilitol sobre la adsorción de macromoléculas a la HAp, el efecto de los polialcoholes puede ser entendido como consecuencia de la sustracción del calcio iónico del sistema por parte de dichos compuestos. De resultar válida esta interpretación, cabría esperar que entre los iones calcio y los polialcoholes se produjera algún tipo de interacción. En apoyo de esta hipótesis observamos cambios en el espectro de absorción infrarrojo del xilitol en presencia de iones calcio (Figura 14), consistente en un corrimiento de las bandas de absorción en la región de los 3200-3600 nm hacia la zona de los 2500-3200 nm, lo cual es indicativo de un fenómeno de quelación (102). A partir de los datos precedentes, se postula que el



xilitol y demás polialcoholes reducen la formación de PA debido a la sustracción de iones calcio del sistema de incubación (Figura 16).

**FIGURA 16. MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA XILITOL Y DEMÁS POLIALCOHOLES**



Esta interpretación tienen su apoyo de manera indirecta en los estudios realizados por Miake et al (103), quienes mostraron que el xilitol afecta la remineralización de las capas superficiales del esmalte, lo que ha sido interpretado por los autores como consecuencia de la interacción del polialcohol con los iones calcio.

El mecanismo de acción hipotetizado es compatible con el hecho de que el tratamiento de la HAp con xilitol al 10%, previo a la incubación con saliva, o el lavado de la PA con dicha solución del polialcohol una vez que el integumento estuvo formado, no modificaron significativamente la cantidad de proteínas y glucoproteínas retenidas por el adsorbente (Tabla 19).

Por cuanto la PA es el precursor obligado para la formación de placa bacteriana, era de esperar que la acción inhibitoria de los polialcoholes también repercutiera sobre la producción de este integumento. Los resultados de nuestra experiencia *in vitro* confirmaron esta predicción: la reducción en la cantidad de PA causada por el xilitol se correlacionó con una disminución similar en el desarrollo de placa bacteriana a partir de una cepa de *Streptococcus mutans* o de flora aeróbica total de saliva (Tabla 15).

Por cuanto los tres polialcoholes ensayados redujeron *in vitro* la formación de PA en una magnitud muy similar ( $\approx 40\%$ ), durante la generación de PA en condiciones similares a las fisiológicas se utilizó una mezcla en partes iguales de xilitol, sorbitol y manitol, ya sea en forma de enjuagatorios o incorporados en gomas de mascar. Bajo condiciones *in situ*, la mezcla de polialcoholes modificó la formación de PA cuando fue aplicada bajo la forma de gomas de mascar, no así en el caso que dichos principios estaban contenidos en enjuagatorios. Este diferente comportamiento podría explicarse atendiendo a la baja sustentividad que presentan estos tres polialcoholes. Pese a que su concentración era

mayor cuando se aplicaron como enjuagatorios (10% P/V), la cual es equivalente a las de presentaciones de colutorios de uso más frecuente, la rápida depuración bucal habría producido una brusca caída en la cantidad de polialcoholes presente en la cavidad bucal, hasta llegar a niveles insuficientes para afectar la producción de PA. Las pruebas de depuración bucal revelan que a los cinco minutos de haber completado los enjuagatorios, la concentración salival de la mezcla de polialcoholes decayó hasta alcanzar valores de alrededor de 1,5% (Figura 13), la cual bajo condiciones *in vitro* tiene muy escaso poder inhibitorio sobre la formación de PA (Tabla 11). En cambio, la incorporación a gomas de mascar habría posibilitado la lenta y continua liberación de xilitol, sorbitol y manitol, asegurando una concentración efectiva para afectar la producción del integumento adamantino.

Los resultados hallados relacionados con el uso de bloques dentarios que contenían PA generada bajo condiciones *in situ* y en presencia de cultivos de *Streptococcus mutans* o de FATS nos indican que cuando la película adquirida se formó luego de realizar un enjuagatorio con la mezcla de xilitol, sorbitol y manitol, la cantidad de PB no era diferente a la de los controles. Por el contrario, el consumo de gomas de mascar conteniendo los polialcoholes durante la formación de la PA ocasionó una reducción en la cantidad de placa bacteriana de ambos maxilares del orden del 30% (Tabla 18).

El efecto inhibitorio de los polialcoholes sobre la producción de PA tiene una relevante significación funcional, habida cuenta de las

importantes funciones que desempeña dicho integumento: control de la difusión y transporte de iones hacia o desde el esmalte, protección frente a la fricción originada por los movimientos masticatorios (8-10,53), y como contrapartida a esas funciones defensivas, participación como sustrato para la adherencia de diversos microorganismos bucales a la superficie dentaria (14,15,104).

La fijación de los gérmenes a la superficie dentaria se produce por diferentes mecanismos, entre ellos la intervención de receptores funcionando como nexo entre la superficie dental y las células bacterianas. Tal mecanismo posee un alto grado de especificidad, fenómeno que explica la selectiva colonización de los dientes.(14,15,105). A medida que las bacterias adheridas aumentan su número, los colonizadores iniciales son receptores para otros microorganismos (coagregación).

Las macromoléculas más involucradas en la retención de gérmenes por la película dental son las glucoproteínas, principales componentes del integumento en el esmalte y el cemento (5), ya que mediante la porción glucídica –que incluye al ácido siálico, componente específico de esas sustancias- pueden interaccionar con las adhesinas localizadas en la superficie de la célula bacteriana (106,107). La reducción en el contenido de glucoproteínas totales y de ácido siálico en particular de la película adquirida producida por la mezcla de polialcoholes contenida en las gomas de mascar podría ser la causa, o una de ellas, de la menor producción de placa bacteriana comentada anteriormente.

Los resultados logrados en condiciones similares a las fisiológicas con la mezcla de xilitol, sorbitol y manitol incorporados a gomas de mascar concuerdan con nuestros hallazgos anteriores operando en un sistema totalmente artificial, e indican que el empleo de estos polialcoholes parece suficientemente justificado como preventivo de las afecciones odontológicas dependientes de la placa bacteriana, en especial la enfermedad de caries, puesto que a las acciones que ejercen sobre los gérmenes (87, 108-110) se le incorpora la capacidad de reducir la producción de película adquirida.

Un comentario especial merece la  $\alpha$ -amilasa, una proteína que interviene en la composición de la película adquirida, formada tanto a partir de la saliva total como de saliva submaxilar y parotídea (2). Esta proteína enzimática tiene la propiedad de unirse selectivamente a varias especies de estreptococos bucales (47-49, 111,112), por lo cual podría desempeñar la función de modular la colonización de los tejidos bucales. Además de servir como receptor bacteriano, la  $\alpha$ -amilasa de la PA puede producir la hidrólisis del almidón alimentario (49-51), con la consiguiente liberación de glucosa; la posterior degradación de este carbohidrato por los gérmenes residentes en la placa bacteriana aportaría ácido láctico al pool de ácidos y de tal forma facilitaría la desmineralización del esmalte. Por lo tanto, las placas con elevado contenido de estreptococos capaces de unirse a la  $\alpha$ -amilasa dispondrían de un alto poder cariogénico. De acuerdo con lo expuesto, es válido pensar que la disminución en la

retención de  $\alpha$ -amilasa a HAp ocasionada por el uso de polialcoholes podría acompañarse de un descenso en el desarrollo de caries.

Se ha demostrado que el uso de polialcoholes como sustitutos totales o parciales de los azúcares dietarios resultan beneficiosos para la salud bucal. Diversos estudios de tipo prospectivo realizados en humanos han mostrado que estos compuestos reducen la formación de placa bacteriana y producen una fuerte disminución en la incidencia de caries (86,87,89 y 108). Este comportamiento es atribuible a diversas acciones: son resistentes a la fermentación, interfieren el metabolismo bacteriano, influyen favorablemente en los procesos de remineralización dental y desplazan la flora microbiana hacia una comunidad menos cariogénica. En opinión de Tanzer (89), la inhibición de la degradación glucolítica de azúcares por *Streptococcus mutans* proporciona una buena explicación para la reducción de caries producida por xilitol, aunque sugiere que también podrían estar implicados otros fenómenos, tales como una disminución de la capacidad de esos microorganismos para unirse a las superficies bucales. Nuestros hallazgos referidos a la reducción de la formación de placa bacteriana a partir de PA generada en presencia de xilitol y de una cepa de *Streptococcus mutans* o de flora aeróbica total y PA apoyan esta hipótesis. Debido al costo relativamente elevado del xilitol, a menudo se lo usa asociado con sorbitol, habiéndose comunicado que la combinación posee la misma eficacia antiplaca de aquel polialcohol (86). Por cuanto la estructura química del sorbitol y manitol es semejante a la del xilitol, es razonable pensar que todos poseen el común

mecanismo de acción de sustraer iones calcio al convertirlo en un producto donde dichas especies químicas no estarían disponibles inmediatamente, y de tal manera disminuir la formación de PA a partir de proteínas y glucoproteínas. Esta cualidad, sumada a otras ya conocidas, hacen del xilitol uno de los fármacos más promisorios en la prevención de la caries dental, ya que como señalan Isokangas *et al* (90), toda intervención dirigida a prevenir la colonización de los dientes por *Streptococcus mutans* conduce a una mejor prevención de la caries que las tradicionales medidas destinadas a incrementar la resistencia de los elementos dentarios.

## VII. CONCLUSIONES

1. La adsorción de proteínas salivales a la HAp, (formación de PA), es un fenómeno relativamente selectivo, que entre otros factores depende de: la disponibilidad de proteínas, pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de determinados iones y tiempo.
2. Los agentes inhibidores-removedores de PB ensayados (clorhexidina, fluoruros, hexetidina), no modifican la retención de proteínas por la HAp.
3. Los polialcoholes xilitol, sorbitol y manitol (sustitutos dietarios de los azúcares), reducen la adsorción de proteínas a la HAp (*in vitro*) y al esmalte dentario humano (*in situ*).
4. La inhibición producida por los polialcoholes es proporcional a la concentración empleada, sin afectar la capacidad adsorbente de HAp ni modificar la solubilidad de PA.
5. La incorporación de monosacáridos y disacáridos no afecta la retención de proteínas a la HAp.
6. El agregado de iones cobre ó magnesio no afectan la retención de proteínas a la HAp. En cambio calcio iónico aumenta la formación de PA, mientras que los fosfatos la disminuyen, ambos en forma proporcional a la dosis empleada. La sustracción de calcio iónico reduce la adsorción de proteínas.



7. El efecto de los iones calcio y fosfato es compatible con el mecanismo sugerido para la producción de PA. Se propone que los polialcoholes actúan sustrayendo iones calcio en conformidad con el modelo aceptado.

8. Los iones fosfato resultan muy efectivos tanto para la inhibición de la formación de PA (100 mM) como para producir su remoción total una vez que se hubo formado (200 mM).

9. Bajo condiciones *in vitro* y a concentraciones muy bajas (3 mM), el oxalato es un potente inhibidor de la formación de la PA, reduciendo en un 85% la retención de proteínas a la HAp.

10. La reducción de la formación de PA producida por los polialcoholes, tanto *in vitro* como *in situ*, determina consecuentemente una menor generación de PB ya sea formada a partir de *Streptococcus mutans* o flora aeróbica total de saliva.

11. En condiciones *in situ* el efecto inhibitorio de los polialcoholes se manifiesta cuando dichos productos se aplican bajo la forma de gomas de mascar, no así al estado de enjuagatorios.

12. El uso de polialcoholes, solos o en combinación con fosfatos y/o fluoruros, constituiría una alternativa de uso clínico para la reducción de la síntesis de PA y PB y por lo tanto para la prevención de enfermedades que dependen de dicho integumento.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dawes C, Jenkins GN, Tongue CH. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. *Br Dent J* 1963; 115: 65-68.
2. Al-Hashimi J., Levine M. J. Characterization of *in vivo* salivary-derived enamel pellicle. *Archs oral Biol.* 1989; 34:289-295
3. Mayhal C W. Cubiertas no mineralizadas de la superficie del Esmalte. En: *Bases Biológicas de la Caries Dental* (Menaker L, Morhart RE, Navia JM, eds), Barcelona, Salvat Editores S.A., 1986, cap 5 pp. 157-175.
4. Lamkin M S, Arancillo AA, Oppenheim FG. Temporal and compositional characteristics of the salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res* 1996; 75: 803-808.
5. Lendeumann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle. A review. *Adv Dent Res* 2000; 14: 22-28.
6. Lamkin M S, Migliari MD, Yao Y, Troxler RF, Oppenheim FG. New *in vitro* model for the acquired pellicle: Pellicle formed from whole saliva show intersubject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation pattern. *J Dent Res* 2001; 80: 385-388.
7. Bernardi G, Giro MG, Gaillard C. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite: some new development. *Biochim Biophys Acta* 1972; 278: 409-420.
8. Hanning M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001;35:142-148.

9. Lissera RG , Yankilevich ERLM de, Battellino LJ. Velocidad de erosión y factores que afectan la desmineralización de dientes humanos *in vitro*. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoamer 1998;48: 73-82.
10. Hanning M., Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res 1999; 33 : 372-379.
11. Hahn Berg IC, Rutland M, Arnebrant. Lubricating properties of the initial salivary pellicle- An AFM Study. Biofouling 2003; 19:365-369.
12. Nancollas GN, Johnsson MAS. Calculus formation and inhibition. Adv Dent Res 1994;8:307-311.
13. Rolla G, Rykke M, Gaare D. The role of the acquired enamel pellicle in calculus formation. Adv Dent Res 1995;9:403-409.
14. Scheie A. Mechanism of dental plaque formation. Adv Dent Res 1994; 8: 246-253 .
15. Busscher H, Van der Mei H. Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res 1997;11:24-32.
16. Einspahr HM, Bugg CE. Esmalte-apatita y caries: estudio cristalográfico. En: Bases biológicas de la caries dental. Eds. Menaker I, Mohart RE, Navia JM. Salvat , Barcelona, 1986, pp203-219.
17. Salinas Nolasco MF, Sánchez Cruz R, Salinas Nolasco M, Vargas Ulloa LE. Diferencias estructurales entre la Hidroxiapatita biogénica y sintética determinadas por técnicas fisicoquímicas. Rev Sanid Milit Mex 2004;58:24-29.

18. Bennick A, Cannon M. Quantitative study of interactions of salivary acidic proline-rich proteins with hydroxyapatite. *Caries Res* 1978; 12: 159-169
19. Mayhall CW. Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *J Periodontol* 1977; 48: 78-91.
20. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendeumann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 2001;46: 293-303.
21. Li J, Helmerjost EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG. Statherin is an *in vivo* pellicle constituent: identification and immun-quantification. *Arch Oral Biol*. 2004;49: 304-385.
22. Hanning C, Attin T, Hanning M, Henze E, Brinkmann K, Zech R. Immobilization and activity of human  $\alpha$ -amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 2004;49:469-475.
23. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor proteins, statherins and histatins, and their crosslinking reactions by oral transglutaminase. *J Dent Res* 1999;78 :1696-1703.
24. Mayhall CW, Concerning the composition and source of acquired enamel pellicle in human teeth. *Arch Oral Biol*. 1970;15:1327-1341.
25. Ofee I, Perry A. Molecular basis of bacterial adherence to tissues. En : *Molecular basis of oral microbial adhesion* (Mergemhgen SE, Rosan B, eds), Washington DC , American Society of Microbiology, 1985, pp 7-13.
26. Slomiany BL, Murty VLN, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID. Tooth surfactant-pellicle lipid and their role in the protection of

dental enamel against lactic acid diffusion in man. Arch Oral Biol 1986;31: 187-191.

27. Slomiany BL, Minty VLN, Mandel ID. Lipids of the enamel pellicle protect against acidic erosion. J Dent Res 1990;69:338-343.

28. Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrofobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. Infect Immun 1983;41: 1190-1196.

29. Emery G, Heaney TG, Stambury JB. Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. Arch Oral Biol 1996; 31:623-625.

30. Sonju T, Rolla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on clean human teeth in vivo. Caries Res 1973;7:30-38.

31. Kuboki Y, Teraoka K, Okada S. X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. J Dent Res 1987;66: 1016-1019.

32. Hay DI, Moreno EC. Statherin and the acidic proline-rich proteins in human saliva: clinical, chemistry and microbiology (Tenuovo JO ed). Boca Raton, CRC Press, 1989, vol I, pp 131-150.).

33. Vacca Smith AM, Bowen WH. The effects of milk kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. Caries Res 2000;34:88-93.

34. Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. Acta Odontol Scand 1995;53:358-362.

- 
35. Carlén A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of Pellicles Formed *in vivo* on Tooth Surfaces in Different Parts of the Dentition, and *in vitro* on Hydroxyapatite. *Caries Res* 1998; 32: 447-455.
36. Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 1992;71:1569-1576.
37. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontics brackets. *J Dent Res* 2002; 81: 411-415.
38. Fine DH, Wilton JMA, Caravana C. *In vitro* adsorption of albumin, immunoglobulin G and lysozyme to enamel and cementum from human teeth. *Infect Immun* 1984; 44:332-338.
39. Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO. Adsorption of whole saliva onto hydrophylic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scand J Dent Res* 1992; 100:346-353.
40. Vassilakos N, Rundergren J, Arnebrant T, Glantz PO. Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol* 1992;37:549-557.
41. Fisher SJ, Prakopphol A, Kajsa L, Murria PA. External radiolabeling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch Oral Biol*. 1983; 32: 509-517.
42. Ruan MS, Di Paola C, Mandel ID. Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed *in vitro* to enamel and cementum from caries-

resistant and caries-susceptible human adults. Arch Oral Biol 1986;31:597-601.

43. Bernimoulin J. Recent concepts in plaque formation. Journal of Clinical Periodontology 2003;30:7-9.

44. Zhan L, Liu T, Fu M. A study on the conjugation of Streptococcus mutans adhesins and its salivary receptors. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 1999; 34:19-21.

45. Scannapieco FA, Solomon L, Wadenya RO. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci. J Dent Res 1994; 73:1627-1635.

46. Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. Prosthet Dent 1992;68:683-691.

47. Scannapieco FA, Bergey MS, Levine MJ, . Characterization of salivary  $\alpha$ -amylase binding to Streptococcus sanguis. Infect immune 1989;57:2853-2863.

48. Scannapieco FA, Bhandary K, Ramasbbu N, Levine MJ. Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human  $\alpha$ -amylase. Biochem Biophys Res Commun 1990;173:1109-1115.

49. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary  $\alpha$ -amylase : role in dental plaque and caries formation. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4: 301-307.

50. Douglas CWI, Pease AA, Whiley RA. Amylase-binding as a discriminator among oral streptococci. FEMS Microbiol Lett 1990;66:196-198.

51. Douglas CWI, Heath J, Gwynn JP. Enzymatic activity of salivary amylase when bound to the surface of oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 1992;92:192-199.
52. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1991; 25:1-6.
53. Amaechi BT, Higham SM, Milosevic A, Edgard WM. Thickness of acquired salivary pellicle as the determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 1999; 78:1821-1828.
54. Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An *in vitro* study. *Caries Res* 2003;37: 225-231.
55. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68:750-760.
56. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBT to apatitic surfaces. *J Dent Res* 1989;68:1303-1307.
57. Clark WB, Beem JE, Nesbitt WE, Cisar JO, Tseng CC, Levine MJ. Pellicle receptors for *Actinomyces viscosus* type I fimbriae *in vitro*. *Infect Immun* 1989;57:3003-3008.
58. Stromberg N, Boren T, Carlen A, Olsson J. Salivary receptors for Gal Nac $\beta$ -sensitive adherence of *Actinomyces* spp : Evidence for heterogeneous Gal Nac- $\beta$  and proline-rich protein receptor properties. *Infect Immun* 1992;60:3278-3286.



- 
59. Fine D. Evaluación de enjuagues antimicrobianos y su eficacia bactericida. JADA (Ed. Argentina) 1997;1: 11-19.
60. Mandel I. Enjuagues antimicrobianos: panorama y actualización. JADA (Ed. Argentina) 1997;1:2-10.
61. Page RC. Review of the guidelines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. J Dent Res 1989; 68:1640-1644.
62. ten Cate JM, Marsh PD. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. J Dent Res 1994; 73:695-703.
63. Council on Dental Therapeutics, American Dental Association. Guidelines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. J Am Dent Assoc 1986; 112:529-532.
64. Heasman PA, Seymour RA. Review: Pharmacological control of periodontal disease. I- Antiplaque agents. J Dent 1994;22:323-335.
65. Gjermo P. Some aspects of drugs dynamics as related to oral soft tissue. J Dent Res 1975;54(special issue B):45-56.
66. Schiott CR, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. the effect of clorhexidine mouthrinses on the human oral flora. J Periodontal Res 1970;5:84-89.
67. Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some clorheridine containing mouthrinses on salivary bacterial counts. J Clin Periodontol 1991; 18:90-93.

- 
68. Rolla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975;54(Special issue B): 57-62.
69. Mandel ID. Chemoterapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 1988;15: 488-498.
70. Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res* 1989;68:1602-1608.
71. Renton Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinses products for plaque inhibition. *J Periodontol* 1996;67:486-489.
72. Lindhe J, Hamp SE, Loe H, Schiott CR. Influence of topical application of chlorhexidine on chronic gingivitis and gingival wound healing in the dog. *Scand J Dent Res* 1970;78:471-478.
73. Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Loe h, Schiott CT. Effect of local application of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *J Periodont Res* 1970;5:177-182.
74. Gjermo P, Bonesvoll P, Rolla G. Relationship between plaque inhibiting effect and retention of clorhexidine in human oral cavity. *Arch Oral Biol* 1974; 19:1031-1034.
75. Gjermo P, Bonesvoll P, Hjeljord L, Rolla G. Influence of variation of pH of chlorhexidine mouthrinse on oral retention and plaque-inhibiting effect. *Caries Res* 1975; 9:74-82.

76. White DJ, Bowman WD, Faller RV.  $^{18}\text{F}$  MAS-NMR and solution chemical characterization of the reactions of fluoride with hydroxyapatite and powdered enamel. *Acta Odont. Scand*,1988,46:375-389
77. ten Cate JM. The effect of fluoride on enamel de- and remineralization In vitro and In vivo. In: Guggenheim B ed. *Cariology Today*. Basel, Karger, 1998, pp:231-236.
78. ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de-and remineralization. *J Dent Res* 1990; 69:614-619.
79. Ogaard B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. *J Dent Res* 1990;69 (special issue):813-819.
80. Petersson IG, Edwarsson S, Arends J. Antimicrobial effect of a dental varnish in vitro. *Swed Dent J*, 1992,16:183-189.
81. Bowden GH. Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque. *J Dent Res*, 1990,69:668-671.
82. Giertsen CD, Scheie AA. Effects of mouthrinses with chlorhexidine and zinc ions combined with fluoride on the viability and glycolytic activity of dental plaque. *Eur J Oral Sci* 1995,103: 306-312.
83. Huizinga ED, Ruben JL, Arends J. Chlorhexidine and thymol release from a barniz system. *J Biol. Buccale* 1991;19:343-348.
84. Birkhed D, Kalfas S, Svensater G. Microbiological aspects of some caloric sugar substitutes. *Int Dent J* 1985;35:9-17.
85. Makinen KK. Sweeteners and prevention of oral caries (special reference to xilitol). *Oral Health* 1988;78:57-66.

- 
86. Trahan I. Xilitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J* 1995;45: 77-82.
87. Scheie AA, Fejerskob OB. Xylitol in caries prevention: what is the evidence for clinical efficacy? *Oral Dis* 1998;4:268-278.
88. van Loveren C. Sugar alcohols: What is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects?. *Caries Res* 2004;38:286-293.
89. Tanzer JM. Xilitol chewing gum and dental caries. *Int Dent J* 1995;45:65-76.
90. Isokangas O, Soderling E, Pienihakkinen K, Alanenm P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xilitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. *J Dent Res* 2000;79:1885-1889.
91. Distler W, Petschelt A, Kroncke A. Protein content and wet weight of plaque microsamples. *Caries Res* 1989;21: 200-203.
92. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
93. Dubois M, Giles KA, Hamilton JK, Reders PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28: 350-356.
94. Bernfeld P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzymol* 1951;12:379-428.
95. Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biochim Biophys Acta* 1985;44:1721-1723.

- 
96. Bernfeld P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . En *Methods in Enzymology*. Eds. Colowick SP y Kaplan NO. Academic Press Inc, publishers. New York, 1955, pp:149-158.
97. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
98. Battellino LJ, Catttoni STD de. *Metodología de la investigación en salud poblacional*. Córdoba, Imprenta Universidad Nacional de Córdoba, 1994, capítulo 9, pp. 133-138.
99. Moreno EC, Kresak M, Hay DI. Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tiss Int* 1984;36:48-59.
100. Tabak LA, Levine MJ, Jain NK, Bryan AR, Cohen RE, Monte LD et al. Adsorption of human salivary mucins to hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1985;30:423-427.
101. Bernardi G, Kawasaki T. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim Biophys Acta* 1968;160: 301-310.
102. Nakamishi K, Solomon PH. *Infrared Absorption Spectroscopy*. Oakland (Holden-Day, INC 2° Ed) pp25. 1977.
103. Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanisawa T. Remineralization effects of xilitol on demineralized enamel. *J Electron Microsc* 2003; 52:471-476.
104. Gibbons R. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* 1996;75:866-870.

- 
105. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doley RJ. Multiple adhesins of streptococci. *Infect immune* 1992;60:2147-2152.
106. Ofek , Perry A. Molecular basis of bacterial adherence to tissues. In: *Molecular basis of oral microbial adhesion* (Mergenhagen E, Rosen B, eds.), Washington DC: American Society for microbiology, pp. 7-13; 1985.
107. Prakobphol A, Fisher SJ. Human salivary pellicle glycoproteins: identification and bacterial receptor activity. In : *Cariology for the nineties*. (Bowen WH, Tabak LA, eds.) Rochester university Press, pp. 107-115;1993.
108. Edgar WM. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries. A review. *Brit Dent J* 1998;184:29-32.
109. Hayes C. The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *J Dent Educ* 2001;65:1106-1109.
110. Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians. *J Calif Dent Assoc* 2003;31:205-209.
111. Douglas CWI. Characterization of salivary  $\alpha$ -amylase receptor of *streptococcus gordonii* NCTC 7868. *J Dent Res* 1990;69:1746-1752.
112. Kilian M, Nyvad B. Ability to bind salivary  $\alpha$ -amylase discriminates certain viridans streptococcal species. *J Clin Microbiol* 1990;28:2576-2577.