

NANOIDENTIFICACION DE BIONES ORIGINADOS A PARTIR DE FORMAS FILTRABLES DE *Streptococcus sanguinis*.

Somaglia L(1), Turcot LG(1), Palacios NP(1), Vilotta SM(1), Rosmino MF(1), Molgatini SL(1), Aldunate M(2), Domínguez A(2), Bozzano P(2) y Zbihlei G(2)

(1). Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina. (2) Departamento de Microscopía Electrónica: CNEAMAT-GME Constituyentes.

Email: nppalacios@yahoo.com.ar

El *Streptococcus sanguinis* (*Ss*) (Fig.1A) es una bacteria grampositiva, cocoidea, que actúa como colonizador primario del esmalte dental humano, asociándose a la etiopatogenia de caries de superficies libres. En su ciclo evolutivo origina espontáneamente formas “L” (sin pared celular): estas son vesículas fosfolipídica de 50 nm a 50 µm, denominándose **Nanovesículas** (NVs) a aquellas menores de 200 nm (Fig.1B). Los **BIONES** (Fig.2), son complejos órgano-minerales, formados por depósitos de sales sobre una matriz orgánica (o núcleo biogénico) compuesta de proteínas, albúmina-fetuínas, moléculas HDL, etc. Poseen alta afinidad por el Ca⁺⁺ y están asociadas a calcificaciones extra esqueléticas (cálculos dentales, salivales, pulpares, renales, placas de ateroma, mamarios). **OBJETIVO:** Evaluar si las NVs de *Ss* pueden actuar como núcleos biogénicos de calcificación en la morfogénesis de cálculo dental. **Procedimiento experimental:** Las NVs de *Ss* se incubaron en caldo Todd-Hewitt (TH) con solución calcificante (SC): NaH₂PO₄ y CaCl₂ 3mM, durante 20 días a 37°C en anaerobiosis (Cultivo Experimental: CEx). Los controles fueron: cultivos de *Ss* sin SC, NVs con SC, SC con TH y TH con NVs. Cultivos y controles se observaron por Microscopía de Campo Oscuro, Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (coloración negativa, con fosfotungstato de sodio al 3%, PH7), Microscopía Electrónica de Barrido-EDS (MEB-EDS) (fijado 24hs en formol al 10%, deshidratado en alcoholes ascendentes y metalizadas para su posterior visualización con Microscopio FEI Quanta 200-EDAX). Se complementó la nanoidentificación de nanoestructuras biológicas, con tinciones de Gram, Giemsa y Von Kossa modificada. Los controles de EDS sobre vidrio fueron de muestras puras de: TH, NVs y SC. Los controles de Von-Kossa fueron extendidos descalcificados del CEx, con HCl al 0,5%. Se efectuaron MEB de perfiles de cálculos dentales fracturados y de perfiles de biofilm dental (fijados en formol al 10% durante 24 hs, deshidratados en alcoholes ascendentes y metalizados) **Resultados:** las lecturas de EDS demuestran mayor calcificación en el CEx (fig.9); en von Kossa del CEx se observa el depósito de plata sobre las NVs (Fig.3). Las concentraciones de Ca⁺⁺ fueron respectivamente: en el cultivo de *Ss*: 3,85%; CEx: 6,05% y en Von Kossa: 7,07% + Ag: 3,58% (índice de Ca fijado a las NVs). Al MEB el CEx exhibe conglomerados y predominio de NVs. (Fig.4). La MET permite observar (Fig.5) NVs de 50-150nm con un contenido granular. Las coloraciones de Giemsa del CEx (Fig.6) demuestran: reversión de las NVs a cocos típicos y las NVs agrandadas por depósito de Ca⁺⁺. Se observan NVs tanto en los perfiles de Biofilm, no calcificadas, como en los de Cálculo Dental, calcificadas. (Fig.7 y 8). **Conclusiones:** Los resultados demuestran la capacidad de las NVs de *S. sanguinis* de calcificarse. La matriz de NVs parece iniciar la mineralización del biofilm y actuar como Biones en la formación del cálculo dental. Las técnicas de Gram, Giemsa y Microscopía de Campo Oscuro son útiles en la evaluación morfológica de *Ss* y NVs. MEB y MET-coloración negativa, son esenciales para el diagnóstico morfológico y de tamaño de los controles de *Ss* y NVs puras. La tinción de Von Kossa y el EDS confirman el depósito de calcio sobre NVs de *Ss* y secundariamente tiñen el ADN del proceso de reversión a formas cocoideas parentales. La combinación

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

de diferentes técnicas de microscopía demuestra ser útil en el diagnóstico diferencial o Nanoidentificación de nanoestructuras biológicas.

REFERENCIAS

[1] Somaglia L, Turcot LG, Bernat MI, Vilotta SM, Palacios NP, Molgatini SL, Rosmino F, Bermolen M, Lavandeira P, Lavandeira H, Giménez D, Domínguez SA, Reynoso-Peitsch P. Nanoidentificación: el MEB en el diagnóstico de formas atípicas de microorganismos de placa subgingival. Acta Microscópica. 2013; 22 (1): 32-36.
 [2] Wu C-Y, Young L, Young D, Martel J, Young JD. Bions: A family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. PLoS One. 2013; 8(9): e75501

FIGURAS

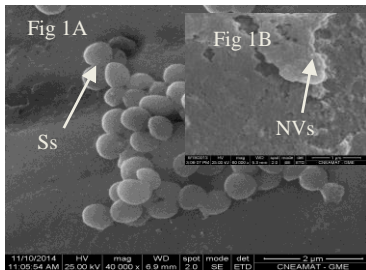


Fig.1A: *S. sanguinis*(Ss): coco de 0,75 a 1 μm . Fig.1B: Nanovesículas (NVs), de 50 a 200nm (controles de forma)

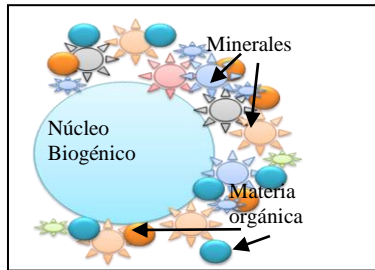


Fig.2: Núcleo Biogénico que crece por aposición de minerales y materia orgánica.

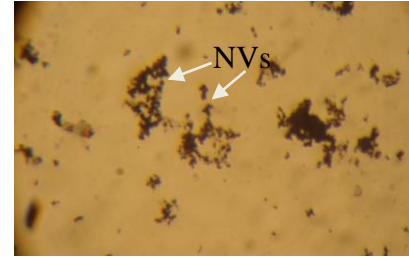


Fig. 3: Von Kossa del CEx.: precipitado negro- de plata-sobre las Nanovesículas puras.

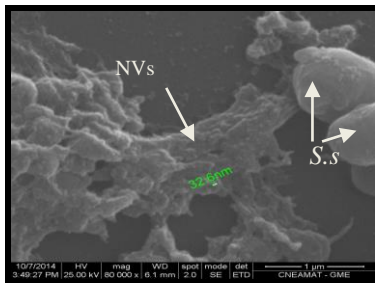


Fig.4: Cultivo de NVs en solución calcificante: Ss, formas revertidas y conglomerado de NVs calcificadas

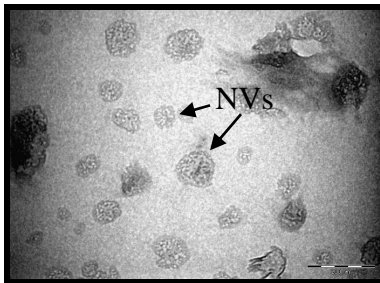


Fig. 5: MET: coloración negativa con Ac. Fosfotúngstico. NVs de 50-150 nm con contenido granular.

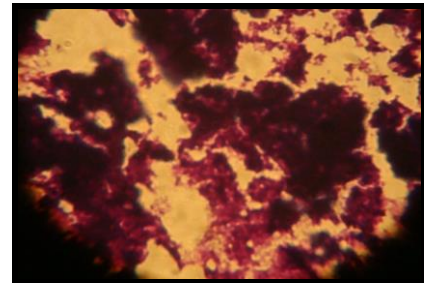


Fig.6: Coloración de Giemsa. Incubación: 20 días con solución calcificante: cocos cubiertos con precipitado de calcio.

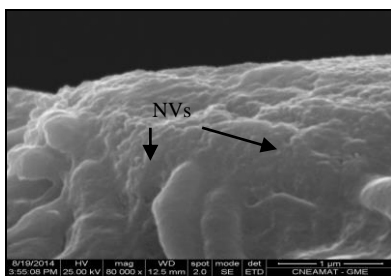


Fig. 7: Perfil de Biofilm de placa dental: NVs como matriz no calcificada.

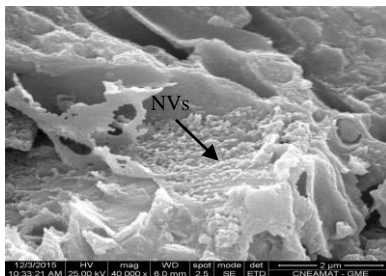


Fig. 8: Perfil de cálculo dental: con NVs de la matriz interbacteriana calcificada.

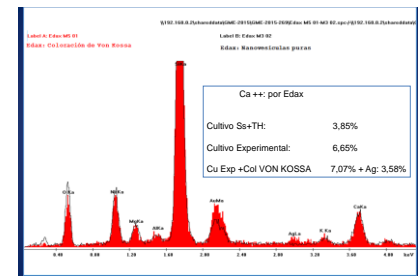


Fig.9: EDS coloración Von Kossa (rojo). EDS NVs puras (negro). En el recuadro se indican los porcentajes de Calcio en las muestras respectivas.