

# NANOIDENTIFICACIÓN: EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO EN EL DIAGNÓSTICO DE FORMAS ATÍPICAS DE MICROORGANISMOS DE PLACA SUBGINGIVAL

L. Somaglia<sup>a\*</sup>, L. Turcot<sup>a</sup>, M.I. Bernat<sup>a</sup>, S.M. Vilotta<sup>a</sup>, N. Palacios<sup>a</sup>, S. Molgatini<sup>a</sup>, F. Rosmino<sup>a</sup>, M. Bermolen<sup>b</sup>, P. Lavandeira<sup>b</sup>, J. Zamberlin<sup>b</sup>, D. Giménez<sup>c</sup>, S.A. Domínguez<sup>d</sup>, P. Reynoso-Peitsch<sup>d</sup>, H.Lavandeira<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. <sup>b</sup>Cátedra de Periodoncia. Universidad Del Salvador/ AOA. <sup>c</sup>Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA), <sup>d</sup>Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEAMAT-GME).

\*Autor de Correspondencia, E-mail: [luissomaglia@yahoo.com.ar](mailto:luissomaglia@yahoo.com.ar). M.T. de Alvear 2142 (Cát. Microbiología, Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires) CP:1122-Congreso 1869 Haedo (CP.1706). Tlf: 0054 4650-3395.

Recibido: Abril 2012. Aprobado: Abril 2012.

Publicado: Enero 2013.

## RESUMEN

El diagnóstico convencional de placa subgingival por microscopía óptica identifica los morfotipos clásicos, excluyendo del estudio a las Formas Atípica (F. At). nanométricas, lo cual genera informes “Falsos negativos”. El objetivo de este trabajo fue reconocer las F.At. Y promover su estudio como una nueva línea de investigaciones- la nanoidentificación- aplicada al conocimiento de la etiopatogenia y curso clínico de las enfermedades periodontales. Se estudiaron por MEB 35 muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. Se reconocieron en todas las muestras, algunas de las variantes de F. At: quistes de treponemas, vesículas endotóxicas, forma compatibles con nanobacterias y micoplasmas, formas consuntivas, cuerpos L de 5 a 15 µm., sincicios de 15 a 30 µm. Y formas filtrables de 50 a 100 nm. Se detectó de manera original la presencia de algunas formas atípicas de bacterias en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. No pudieron diferenciarse las formas persistentes de las bacterias típicas, ni las nanobacterias de las formas consuntivas. El estudio de las formas atípicas de microorganismos periodontales es un nuevo campo de investigaciones en Periodoncia y requiere de estudios longitudinales para evaluar su relevancia en la ecología periodontal así como en el diagnóstico, pronóstico, nuevas modalidades terapéuticas y/o etiopatogenia de las enfermedades periodontales.

**Palabras claves:** Formas- L, micoplasmas, espiroquetas, periodontitis, Nanoidentificación.

## NANOIDENTIFICATION: SCANNING ELECTRON MICROSCOPE IN THE DIAGNOSIS OF ATIPICAL FORMS FROM SUBGINGIVAL PLAQUE MICROORGANISMS.

### ABSTRACT

The usual diagnosis of subgingival plaque by optical microscopy identifies the classic morphotypes excluding the Atypical Forms (At.F.) nanometrics, and “false negative” reports were generated. The aim of this study was to know the At. F. and support the study as a new line of research – the nanoidentification- for their application in clinical and pathogenesis course during the periodontal disease. Thirty-five samples from patients with chronic periodontitis were studied by MEB. All samples showed some variants of At. F: treponemes cysts, endotoxic vesicles, both compatible with nanobacteria and mycoplasma, consumptive forms, L-bodies from 5 to 15µm, syncytia 5 to 30 µm and filterable forms from 50 to 100 nm. We found the presence of some atypical bacteria in subgingival plaque with chronic periodontitis by an original way. Persistent forms of typical bacteria or nanobacteria could not differentiate. The study of atypical forms in periodontal microorganisms is a new field of research in periodontology and needs longitudinal studies to assess their relevance in periodontal diagnosis, prognosis, new therapeutic modalities and/ or pathogenesis of periodontal disease.

**Keywords:** L-forms, mycoplasma, spirochetes, periodontitis, nanoidentification.

## INTRODUCCIÓN

Las formas atípicas de bacterias son aquellas que presentan morfologías y/o estructuras y/o comportamientos no convencionales a los prototipos bacterianos conocidos.

Incluyen a micoplasmas [1,2], variables de formas L - protoplastos, esferoplastos, grandes cuerpos-L., sincicios [3-7], quistes de treponemas [8-9], vesículas [10], nanopartículas calcificantes [11-13], formas consuntivas (starvation forms) [14-15] y formas persistentes (persister cells) [16-17-18].

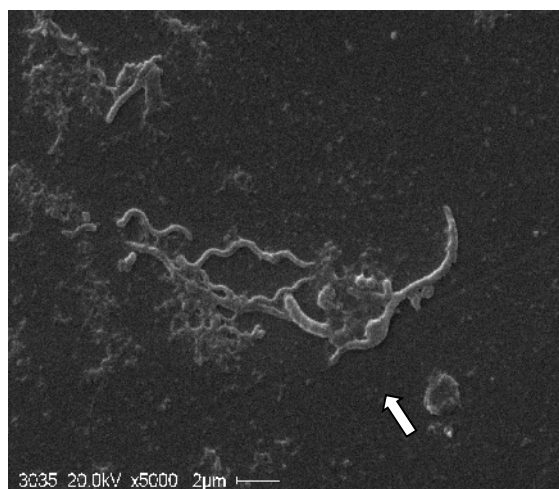
El diagnóstico convencional de placa subgingival basado en los métodos de microscopía, ya sean de campo claro u oscuro, o por fluorescencia, identifican los morfotipos clásicos (cocos, bacilos y espiroquetas) excluyéndose de los informes de microbiología (cuali-cuantitativamente) las formas bacterianas no convencionales, esto induciría consecuentemente a informes “Falsos negativos”. Estas variables morfológicas podrían actuar como formas de resistencia y ser las responsables de los ciclos de recidivas – recaídas de las enfermedades periodontales [20], De su estudio podría caracterizarse si estas patologías inmunoinfecciosas son de curso crónico y/o latente. El objetivo primario de este primer trabajo fue reconocer por MEB la presencia de formas atípicas de microorganismos en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica y promover su estudio como nueva

línea de investigaciones - la Nanoidentificación- aplicado al conocimiento de la etiopatogenia y curso clínico de las enfermedades periodontales. Este proyecto, además, podría aportar datos sobre la relevancia de estas variantes en la ecología periodontal, el pronóstico y/o la necesidad de nuevas modalidades terapéutico-preventivas, así como de su repercusión sistémica a partir del reservorio periodontal, vehiculizados por bacteriemias.

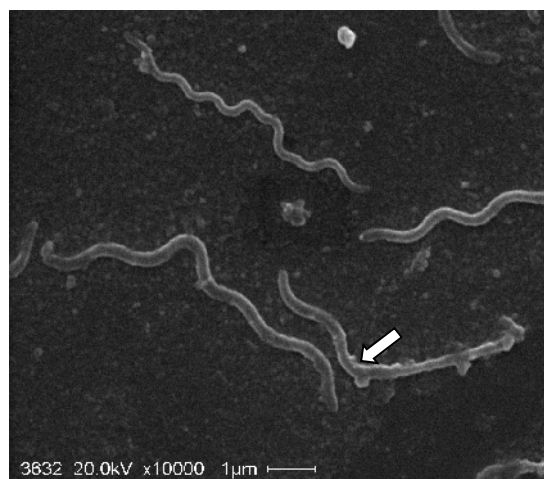
## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 35 muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica las que fueron fijadas con formol al 10% durante 24hs., deshidratadas con alcoholes ascendentes y metalizadas para ser visualizadas en un microscopio electrónico de barrido Phillips 515 (CITEFA) y FEI Quanta 200 (CNEA).

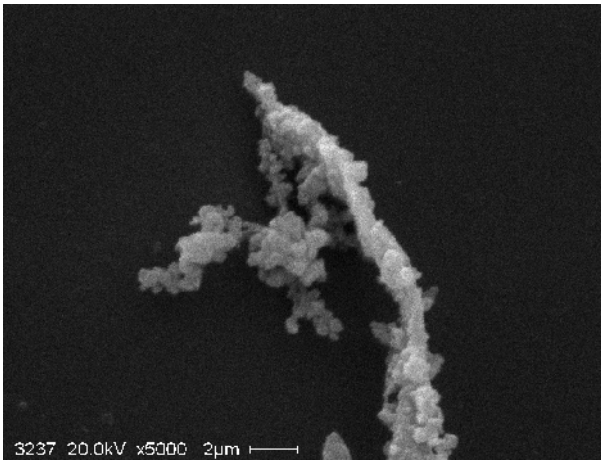
Para el diagnóstico morfológico, se efectuó previamente un archivo de imágenes consultando unas 40.000 trabajos de publicaciones microbiológicas on- line: de éstas, específicas de formas atípicas, se seleccionaron unos 50 trabajos, de los cuales sólo 3 fueron del campo periodontal [1, 2, 9]. Se observaron también por MEB, preparaciones de cultivos “in Vitro” de *Streptococcus sanguinis*, como imágenes propias de referencia en formación de grandes cuerpos- L. (fig: 9 y 10).



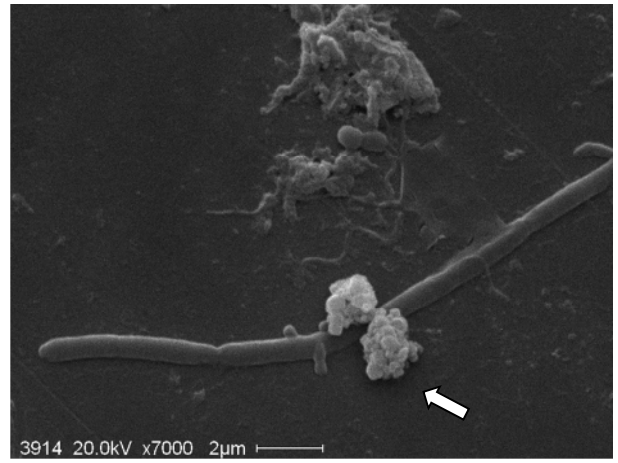
**Fig. 1.** Quietes de treponemas de 800nm.



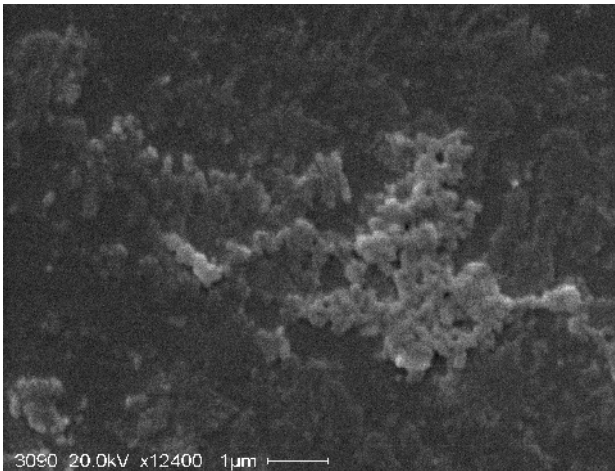
**Fig. 2.** Vesículas de endotoxinas (lipopolisacáridos).



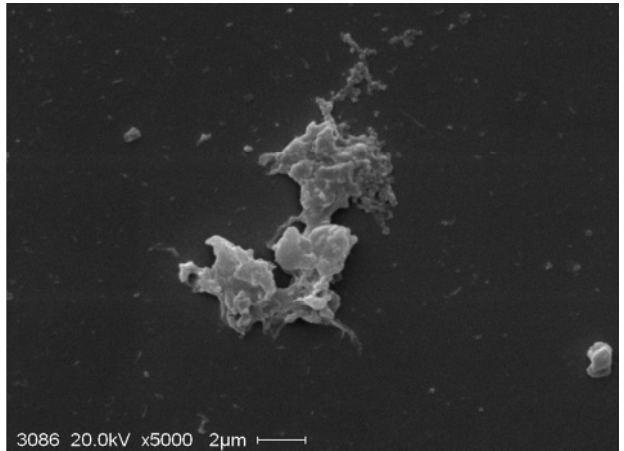
**Fig. 3.** Estructuras de 300 nm., agregadas a filamentos.



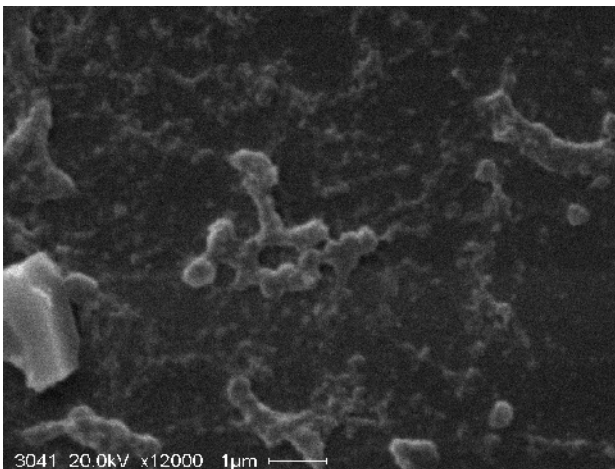
**Fig. 6.** Dos pequeños cuerpos L adheridos a bacilos.



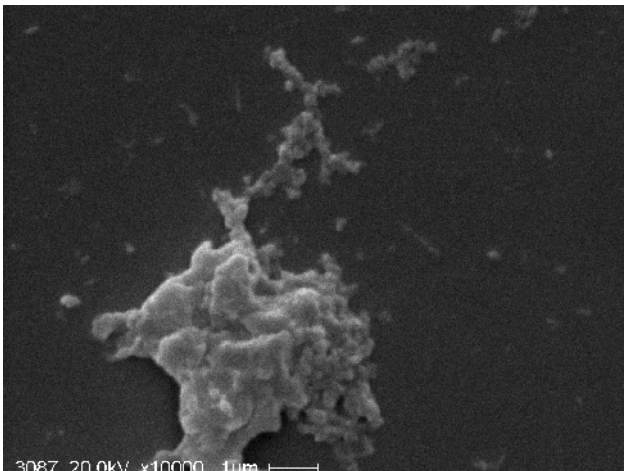
**Fig. 4.** formas compatibles con nanobacterias o formas consuntivas de aproximadamente 250 nm.



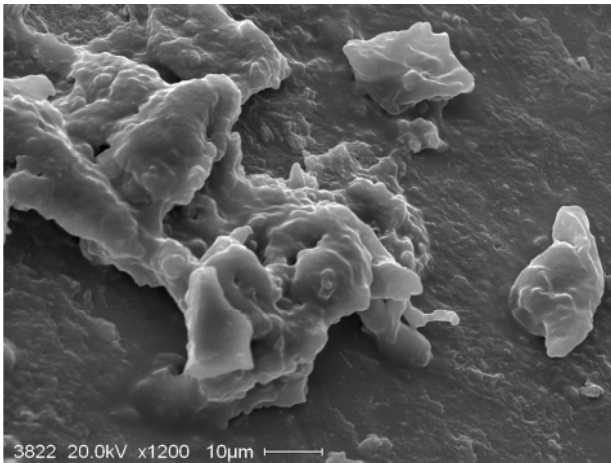
**Fig. 7.** Sincicios: acúmulo de cuerpos L.



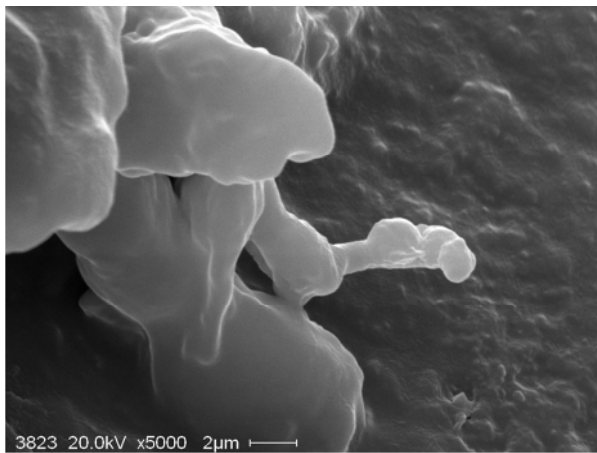
**Fig. 5.** Estructura anular compatible con micoplasmas.



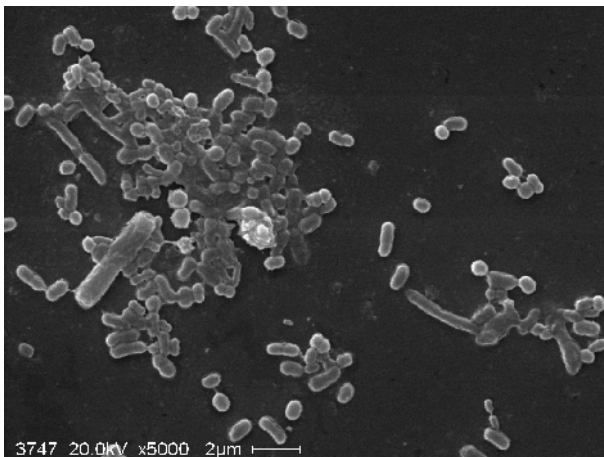
**Fig. 8.** Sincicio liberando "bacterias filtrables".



**Fig. 9.** Sincicios y cuerpos L de *Streptococcus sanguinis* cultivo in vitro.



**Fig. 10.** Prolongaciones filamentosas del sincicio de figura 9.



**Fig. 11.** Casos sanos, predominan formas cocoideas normales con escasas o nulas formas atípicas.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudo detectar de manera original la presencia de formas atípicas de bacterias en

placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. Se encontraron, variables de formas L, sincicios, quistes y vesículas treponémicas y presuntivamente formas consuntivas.

No pudieron diferenciarse las formas persistentes de las bacterias típicas, ni las nanobacterias de las ultramicrobacterias o bacterias filtrables.

El estudio de las formas atípicas de microorganismos periodontales es un nuevo campo de investigaciones en Periodoncia.

Se requieren nuevos estudios longitudinales para evaluar su relevancia en la ecología periodontal, así como en el diagnóstico, pronóstico, nuevas modalidades terapéuticas y/o etiopatogenia de las enfermedades periodontales.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece a los Técnicos y Operadores Microscopistas, por la valiosa labor técnica y de asesoramiento en el perfeccionamiento del modelo experimental.

Financiamiento: Subsidiado por el Programa de Apoyo a la Investigación AOA.2009.

## REFERENCIAS

- [1] Crespo J.D., Sa-Fleitas M.J., Negroni M., Somaglia L., Santoro N., Turcot L., Rosa A. (1974) "Aislamiento y estudio de cepas locales de Mycoplasma de enfermedad periodontal y de grupos controles normales". *Rev. AMA*.87:43-46.
- [2] Rivera Tapia J.A., Román Méndez C. (2003) "Posible papel de Mycoplasma salivarium y Mycoplasma fermentans en la periodontitis". *Revista ADM*. 9 (4):142-144.
- [3] Bibel D.J., Lawson J.W. (1972) "Development of streptococcal L-form colonies" *J.Bacteriol*. 112 (1): 602-610.
- [4] Cohen R.L., Wittler R.G., Faber, J.E. (1968) "Modified biochemical tests for characterization of L-phase variants of bacteria" *Appl. Microbiol*. 16 (11): 1655-1662.

- [5] Dienes L., Bullivant, S. (1967) "Morphology and reproductive processes of the L forms of bacteria" *J.Bacteriol.* 95(9):672-687.
- [6] Fass R., Carleton J., Watanakunakron C., Klainer W., Hamburger M.(1970). "Scanning beam electron microscopy of cell wall-defective staphylococci". *Infect.Immun.* 2 (4): 504-515.
- [7] Weibul C., (1965) "Structure of bacterial L forms and their parent bacteria".*J.Bacteriol.* 90 (5):1467-1480
- [8] Brorson O., Brorson S.H., Scythes J., Mac Allister J., Wier A., Margulis L. (2009) "Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline". *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 106 (44); 18657-18661.
- [9] Listgarten M.A., Socransky S.S. (1964) "Electron Microscopy of axial fibrils, outer envelope, and cell division of certain oral spirochetes".*J. Bacteriol.* 88 (4); 1087-1103.
- [10] Li Z.,Clarke A.J., Beveridge T.J. (1998) "Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria". *J.Bacteriol.* 180 (20): 5478-5483.
- [11] Kajander O., Neva C. Nanobacteria (1998) "An alternative mechanism for pathogenic intra-and extracellular calcification and stone formation" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* July 95: 8274-8279.
- [12] Schwartz M.A.K., Lieske J.C , Farel-Baril G., Miller V.M. (2008) "Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: proof of principle" *Int. J. Nanomedicine* 3 (2):243-248.
- [13] Velimirov B. (2001) "Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium". *Japanese Society of Microbial Ecology.* 16 (2): 67-77.
- [14] Joseleau-Petit D., Vinella D., Dári R. (1999) "Metabolic alarms and cell division in *Escherichia coli*" *J.Bacteriol.* 181 (1): 9-14.
- [15] Watson S.P., Clements M.O., Foster S.J. (1998) "Characterization of the Starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*" *J.Bacteriol.* 180(7): 1750-1758.
- [16] Lewis K. (2004) "Persisters cells and the riddle of biofilm survival". *Biochemistry (Moscow)* 70 (2): 267-274.
- [17] Lewis K. (2010) "Persister cells" *An. Rev. Microbiol.* 64: 357-372.
- [18] Suzina N.E., Esikova T.Z., Akimov V.N., Abashina T.N., Dmitriev V.V., Politseva V.N., Duda V.I., Boronin A.M. (2008). "Study of ectoparasitism of ultramicrobacteria of the genus *Kaistia*, strains NF1 and NF3 by Electron and Fluorescence Microscopy" *Microbiology*, 77 (1): 47-54.
- [19] Onwuamaegbu M.E., Belcher R.A., Soare C. (2005) "Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance". *The Jour. Int. Med. Res.*33; 1-20.
- [20] Somaglia L., Turcot L., Bernat M. I. (1995) "Placa microbiana: enfoque infectológico –ecológico". *Rev. Ateneo Arg. de Odontología.*34 (1):9- 17.