



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Análisis de los determinantes genéticos de formación y/o disgregación de biocapas bacterianas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

BIÓL. TECILLI CABELLOS AVELAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE MEMBRILLO HERNÁNDEZ

MÉXICO D.F.

JUNIO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este trabajo de tesis, se contó con el apoyo de una beca del CONACyT con número de registro 189664.

También se contó con el apoyo de la beca complemento de la DGEP, UNAM.

Agradezco los apoyos de los proyectos Grant 42580 de CONACYT y IN207703 de PAPIIT UNAM.

Agradezco el apoyo del comité tutorial:

Dr. Sergio Encarnación Guevara
Dra. Valeria Francisca E. L. M. Souza Saldivar

Agradezco el apoyo del jurado para el examen de grado:

Dra. Carmen Gómez Eichelman
Dr. Jorge Membrillo Hernández
Dra. Laura Camarena Mejía

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la asistencia técnica de Sr. Miguel Páez, del Dr. Luis Delgado, del Dr. Jesús Ramírez, de la M. en C. Laura Espinosa, de la QFB. Lourdes Marínez. De la TLC. Guadalupe Paredes, del M. en C. Marco Antonio Rogel y del Biól. Augusto Ramírez.

Agradezco a el tutor de esta tesis el Dr. Jorge Membrillo y a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Microbiología y Genética Molecular a los que están y los que alguna vez estuvieron, como Elizabeth Hernández, Alondra Díaz, Marcela Mendéz, José Ponce, Nora Urrea, Luisa Sandoval, Gerardo Croda, Marco Naveda, Adriana Corvera y Juan Luis Chavéz, por todos los comentarios y sugerencias realizados a el proyecto de investigación sobre biofilms.

Agradezco al Dr. Rafael Camacho por el préstamo de la cámara de anaerobiosis, al Dr. Roberto Coria por el préstamo de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, a la Dr. Gloria Soberón y a Marisela Aguirre por la colaboración en investigación sobre *Pseudomonas aeruginosa*, a la Dra. Lourdes Girad y a Nicolás por el préstamo de la jarra que mantiene el oxígeno al 1% y a Sebastián Poggio por su ayuda con la microscopia.

Agradezco a Rodolfo Paredes Díaz de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradezco a la UNAM, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la Facultad de Ciencias, al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Biológicas en especial al Dr. Juan Nuñez, Lilia Espinosa, Lilia Jiménez, Gonzalo Valdez, Dolores Rodríguez, Ma. de Jesús Márquez y Alejandro Rebollar y a Blanca Huerta del IIB.

Agradezco al Hospital Magdalena de las Salinas del IMSS por dejarme casi como nueva, pero principalmente a mi terapeuta física Natalie Torices y su familia, por brindarme toda la ayuda para recuperar mi total capacidad motriz.

DEDICATORIA

“El respeto es un valor que no se hereda, se adquiere”.

A la memoria de mi abuela Guadalupe Leyva Maldonado, que llevo siempre en mi corazón.

A mi abuelo-papá Pablo Avelar Hernández, que es mi fuente de inspiración y de fortaleza.

A mi familia, mi mamá Ma. Francisca Avelar Leyva, mi papá Angel Cabellos Quíroz, mi hermana Analí Cabellos Avelar (alias la muppett, anis, ranalí, bombiux, aneta), por todo el apoyo que me han dado tanto en las buenas y en las malas, ya que esta tesis es también de ellos.

A mi familia Avelar Leyva que radican en Calpulalpan, Tlaxcala, por todo su cariño y amor, en especial a mis tías Marcela (Chela), Angelina, Lucia Guadalupe, Concepción (Concha), a mis tíos Sebastián y Pablo. A mis primos Pablo (Pabin, Pavo), Sebastián (Nan), Manuel Omar, Azeen, Alfredo (Fedo), a mis primas Marlene (y su esposo Bernardino), Anabel, Estrella (Estrellita), Anel, Sandra (Sandy) y a mis sobrinos Martín y Neitan.

A mi familia Cabellos Quiroz que radica en Colima, Michoacán y Estados Unidos.

A Alfonso Reyes Lugo (la ratilla, big Mouse, la rata) por su compañía, cariño y apoyo durante todo este tiempo.

A mis amigos (as), compañeros (as) y colaboradores. En especial a Deyanira Pérez, Itzel Benítez, Rodrigo, Iván Luna, Iván Limón, Erendira Romero, Rafael López, tía Teresa Miranda, Raúl Zubieta, Aarón (Chino), Fernando (Pey), Paola, Felipe, Ernesto, Alejandra, Nancy, Aurora, Nadia, Romeo, Gimena, Francina, Silvana, Sra. Ma. Dolores Ortega, Sr. Martín Muñoz, Luisa Alcalá, Alfredo Castillo, Eduardo Vázquez, Lucia Huerta, Fernando (Lucio), Luis Miguel, al Pelucas, al Pelos, Oswaldo, Ricardo, Pilar, Benjamín, Nayelli, Alberto Quiroz, Aline Lourdes Lloret, Ernesto Oviedo y Natividad Cabrera. Una mención especial al Sr. Francisco Malacara y al Sr. José Marti Ramírez.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. BIOFILMS.....	4
1.1.1. ¿QUÉ SON LOS BIOFILMS?	4
1.1.2. ETAPAS DE LOS BIOFILMS.....	4
1.1.2.1. Adhesión	6
1.1.2.2. Microcolonias.....	7
1.1.2.3. Crecimiento	8
1.1.2.4. Maduración.....	8
1.1.2.5. Disgregación	8
1.1.3. VENTAJAS ECOLÓGICAS DE VIVIR EN BIOFILM	9
1.1.4. IMPORTANCIA DE LOS BIOFILMS	10
1.1.4.1. Importancia industrial de los biofilms.....	11
1.1.4.1. Importancia de los biofilms en la salud.....	11
1.1.4.2. Importancia de los biofilm en el ambiente	12
1.1.5. CLASES DE BIOFILMS	12
1.1.5.1. Mixtos.....	12
1.1.5.2. Uniespecie.....	12
1.1.6. FACTORES AMBIENTALES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL BIOFILM	13
1.1.6.1. Nutrientes	13
1.1.6.2. pH.....	13
1.1.6.3. Oxígeno.....	13
1.1.6.4. Quórum sensing.....	14
1.1.7. FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL BIOFILM	15
1.1.7.1. Genes involucrados.....	16
1.1.7.2. Proteomas de los biofilms	19
1.2. <i>Escherichia coli</i> COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y/O DISGREGACIÓN DE BIOFILMS.....	21
1.2.1. <i>E. coli</i>	21
1.2.1.1. Estudios de la formación de biofilms en <i>E. coli</i>	22
1.2.1.2. Selección de mutantes mediante el método de tinción por cristal violeta	23
1.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOFILMS DE <i>E. coli</i>.....	23
1.2.2.1. Ácido colánico	23
1.2.2.2. Fimbrias.....	23
1.2.2.3. Proteínas de autotransporte	24
1.2.2.4. Celulosa	24
1.2.2.5. Curli.....	25
1.2.2.6. Flagelo y motilidad.....	25
1.2.3. ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN <i>E. coli</i>	26

1.3. OBJETIVO DE ESTA TESIS.....	27
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
2.1. CEPAS BACTERIANAS	28
2.1.1. Cepas de laboratorio.....	28
2.1.2. Cepas ambientales	28
2.1.3. Bacteriófagos utilizados en este trabajo	28
2.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS	28
2.3. MEDIOS DE CULTIVO	29
2.3.1. Medios de cultivo y condiciones aeróbicas	29
2.3.2. Medios de cultivo y condiciones anaeróbicas	29
2.4. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS	29
2.5. MÉTODOS FISIOLÓGICOS	30
2.5.1. Cinéticas de crecimiento.....	30
2.5.2. Ensayos de la formación de biofilm	30
2.5.3. Detección y cuantificación del biofilm mediante tinción con cristal violeta	30
2.5.4. Cinéticas de formación de biofilm	31
2.5.5. Ensayos de motilidad.....	31
2.5.6. Análisis del afecto de los sobrenadantes (SN)	31
2.5.6.1. Obtención de sobrenadantes	31
2.5.6.2. Mezcla de células y SN	32
2.5.7. Cinética de producción del factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico	32
2.5.8. Naturaleza del factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico... ..	33
2.5.9. Microscopia electrónica de transmisión	33
2.5.10. Ensayos de aglutinación.....	34
2.6. MÉTODOS BIOQUÍMICOS	34
2.6.1. Expresión de fimbria y producción de celulosa.....	34
2.6.2. Geles de poliacrilamida.....	34
2.7. MÉTODOS GENÉTICOS	36
2.7.1. Banco de mutantes	36
2.7.1.1. Preparación del lisado con fago λ	36
2.7.1.2. Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10.....	36
2.7.2. Transformación con plásmidos	37
2.7.3. Transducción de mutaciones mediada por el bacteriófago P ₁	38
2.7.3.1. Preparación de lisados del bacteriófago P ₁	38
2.7.3.2. Transducción al genoma con el bacteriófago P ₁	38
2.8. MÉTODOS MOLECULARES	39
2.8.1. Obtención de DNA genómico	39
2.8.2. Obtención de DNA plasmídico.....	40
2.8.3. Digestiones de DNA.....	41
2.8.4. Geles de agarosa.....	41
2.8.5. Southern blotting.....	41
2.8.5.1. Transferencia del DNA por capilaridad.....	42
2.8.5.2. Fijación del DNA a la membrana.....	43
2.8.5.3. Marcado de la sonda	43
2.8.5.4. Hibridación	43
2.8.5.5. Lavado de la membrana.....	43
2.8.5.6. Generación y detección de señal luminosa	44

2.8.5.7. Revelado de película autoradiografica	44
2.8.6. Clonación por ligación de fragmentos de DNA	44
2.8.7. Purificación de fragmentos de DNA en solución.....	45
2.8.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa	45
2.8.9. PCR	
2.8.10. Secuenciación	46
2.8.11. Geles tipo Eckardth (perfil genómico).....	46
2.9. MÉTODOS BIOINFORMATICOS	47
2.9.1. Alineamiento de secuencias	47
2.9.2. Análisis tipo BLAST	47

3. RESULTADOS “ANÁLISIS DE UN BANCO DE MUTANTES”..... 48

3.1. Razonamiento de los experimentos.....	48
3.2. Estrategia a seguir	48
3.3. Aislamiento de mutantes.....	49
3.4. Análisis de las mutantes	49
3.4.1. Formación de biofilm de las mutantes	49
3.4.2. Cinética de crecimiento de las mutantes	50
3.4.3. Cinéticas de formación de biofilm de las mutantes.....	51
3.4.4. Motilidad de las mutantes	56
3.4.5. Expresión de pili tipo 1 y producción de celulosa de las mutantes	57
3.4.6. Transducción del fenotipo de las mutantes a MG1655 y W3110.....	58
3.4.7. Formación de biofilm de las transductantes.....	58
3.4.8. Motilidad de las transductantes	59
3.4.9. Mapeo de la inserción del transposon de las mutantes	60
3.4.10. Secuenciación	62

4. RESULTADOS “ANÁLISIS DE CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE DIFERENTES AMBIENTES”..... 63

4.1. Razonamiento de los experimentos.....	63
4.2. Estrategia experimental	63
4.2.1. Selección de cepas ambientales de <i>E. coli</i> capaces de formar biofilm en anaerobiosis en diferentes medios	63
4.3. Formación de biofilm de <i>E. coli</i> ambientales.....	70
4.4. Secuencias del 16S	72
4.5. Cinéticas de crecimiento de <i>E. coli</i> ambientales.....	72
4.6. Cinéticas de formación de biofilm de <i>E. coli</i> ambientales	73
4.7. Motilidad de <i>E. coli</i> aisladas del medio ambiente	75
4.8. Expresión de fimbrias y producción de celulosa	81
4.9. Presencia de plásmidos en las cepas aisladas de diversos ambientes.....	82
4.10. Efecto de los sobrenadantes en la formación de biofilm.....	83
4.10.1. Participación de moléculas extracelulares en la formación del biofilm	83
4.11. Cinética de la producción del factor que promueve la formación de biofilm en anaerobiosis de W3110	87
4.12. Naturaleza del factor que promueve la formación de biofilm en anaerobiosis de W3110	87
4.12.1. Efecto del pH de los sobrenadantes en la formación de biofilm	87

4.12.2. Efecto de la temperatura, de la actividad enzimática y de la DNAsa I, en los sobrenadantes.....	88
4.12.3. Efecto de extracciones orgánicas en los SN	89
4.13. Visualización del contenido de proteínas de los SN	90
4.14. Expresión de fimbria mediante el ensayo de aglutinación	92
4.15. Microscopia electrónica de transmisión	92
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES “ANÁLISIS DE UN BANCO DE MUTANTES”	94
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES “ANÁLISIS DE CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADAS DE DIFERENTES AMBIENTES”	97
7. REFERENCIAS	105
8. APÉNDICES	
8.1 Artículo anexo con resultados y discusión adicionales (Cabellos-Avelar <i>et al.</i> , 2006).	
8.2 Escritos: Cabellos-Avelar Tecilli y Membrillo-Hernández Jorge. “Biología Molecular e Importancia de las Biocapas Bacterianas”. Memorias del Congreso de Biología Oral II. Facultad de Odontología, UNAM. Diciembre, 2005.	

RESUMEN

Desde el inicio de la Microbiología el metabolismo bacteriano ha sido estudiado en cultivos líquidos puros o de una sola especie. Esta forma de estudiar a las bacterias no es la forma de vida que tienen en el ambiente natural ya que normalmente existen en asociaciones formando comunidades sésiles adheridas a una superficie conocidas como biocapas o biofilms. La importancia del estudio de los biofilms, radica en el impacto que tienen en el área ambiental, industrial y clínica. El proceso de formación de biofilms comienza con la adhesión de células bacterianas a superficies abióticas o bióticas, seguido por la formación de microcolonias, la maduración del biofilm y finalmente su disgregación. El estudio del proceso de formación de biofilms en bacterias ha permitido la caracterización de moléculas importantes durante las diferentes etapas de este proceso. En *Escherichia coli* como en otras bacterias se ha demostrado por medio del método de tinción por cristal-violeta, que el biofilm se forma como un anillo en la interfase aire-liquido, sugiriendo que el oxígeno juega un papel importante en este proceso.

Previos estudios en nuestro laboratorio sobre cinéticas de formación de biofilm de *E. coli* K-12 por el método de tinción por cristal violeta, encontraron que existe un máximo de producción de biofilm a las 24 horas de cultivo aeróbico y que a partir de este tiempo inicia la disgregación de biofilm, en el presente trabajo se aisló una mutante que es capaz de mantener un máximo de producción de biofilm hasta 52 horas.

También datos previos obtenidos en el laboratorio demuestran que cepas de *E. coli* K-12 no son capaces de formar biofilm en condiciones anaeróbicas aún después de 96 horas de incubación en medio LB. En el presente trabajo se presenta evidencia de la formación de biofilm de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes en condiciones anaeróbicas y que el sobrenadante (SN) proveniente de cultivos aeróbicos o anaeróbicos de cepas ambientales promueve la formación de biofilm bajo condiciones anaeróbicas de *E. coli* W3110 (cepa de laboratorio). Nuestros datos nos permiten proponer que *E. coli* W3110 no sintetiza una molécula señal que le permitiría hacer biofilm en condiciones anaeróbicas, pero tiene toda la maquinaria necesaria para responder a la molécula secretada por las cepas ambientales de *E. coli*.

ABSTRACT

The prevailing bacteria lifestyle is a sessile structure called biofilm. Biofilms are communities of microorganisms attached to a surface. The importance of their study lies on the negative impact of biofilms on industrial, medical and environmental settings. The study of bacterial biofilms has led to the identification and characterization of different molecules required throughout the course of biofilm formation. Using the crystal violet staining method, we demonstrated that In *Escherichia coli*, it has been shown that biofilms are formed at the air-liquid interface. These data suggested that oxygen might be important in the process of biofilm formation. It has been now widely recognized that biofilms is the natural living style of bacteria and their study has been intensified in recent years. *E. coli*, a facultative Gram-negative bacterium has been a useful model for the study of biofilm formation, especially in the identification of genetic determinants that regulate the attachment, maturation and detachment processes.

In our laboratory we recently reported an improved method for biofilm we determined the kinetics of biofilm formation in aerobic cultures of *E. coli* using the crystal-violet staining method and reported that biofilm formation is made at the air-liquid interface having a maximal adhesion at 24 h of growth followed up by a detachment processes. In this work, after analyzing 5000 transposon-induced mutants we found to isolate two *E. coli* laboratory strain mutants with the ability to form biofilm under aerobic growth conditions more that the wid type after 52 h.

In our laboratory we recently reported that anaerobically growing *E. coli* cultures were unable to form biofilms despite the fact that they reached stationary phase of growth. Addition of alternative electron acceptors such as nitrate, nitrite, DMSO-molibdate or fumarate did not promote biofilm formation. Further studies demonstrated that lack of oxygen is a detachment signal and that probably the biofilm formation kinetics of aerobically growing cultures starts a detachment process when the cultures reach anaerobiosis. We checked all the available laboratory strains and found that none had the ability to form biofilm under anaerobic growth conditions. Our failure to isolate an *E. coli* mutant strain either by a transposon-induced or a chemically-induced mutation with the ability to form biofilm in the absence of oxygen led us to take an environmental approach. In this work we will report on a study taking *E. coli* from different environments. After the analysis of 77 *E. coli* strains

isolated from different mammals hosts, lakes and rivers we found one strain that had the ability to form biofilms under anaerobic conditions. We determined the kinetics of biofilm formation under aerobic and anaerobic growth conditions, swimming, swarming and twitching motility abilities and its production of curli fimbriae, flagella and cellulose. Finally we reported on our results using spent media from aerobic or anaerobic cultures of this strain due to the fact that it promotes biofilm formation of laboratory strains that normally are unable to form biofilm under anaerobic growth conditions. We presented evidence of the biofilm formation, and the process of attachment and detachment in aerobic and anaerobic conditions of cultures of this environmentally isolated strain. Our results led us to propose that laboratory *E. coli* strains do not release (or synthesize) a signal or structural molecule needed for biofilm formation under anoxic conditions but that they bear all the required receptor(s) and machinery needed for this process.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOFILMS

1.1.1. ¿QUÉ SON LOS BIOFILMS?

Los microorganismos se han aislado de diversos ambientes (De los Ríos *et al.*, 2003), se ha logrado identificar y clasificar la estructura de las comunidades bacterianas (Doggett 2000; Lawrence *et al.*, 2004; Rickard *et al.*, 2002; Wimpenny *et al.*, 2000), como la placa dental que contienen más de 500 taxas (Kolenbrander, 2000; Kolenbrander *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios de las células bacterianas sobre la genética, la biología molecular, el crecimiento, el metabolismo, la adaptación y la fisiología se han hecho con cultivos de una sola especie. Recientemente se ha visto que los microorganismos procariontes como eucariontes se asocian formando comunidades complejas que se adhieren a una amplia variedad de superficies, llamados biocapas o biofilms. El concepto de biofilm fue acuñado en 1978 por Bill Costerton (Montana State University, Bozeman, MT, USA) y en los últimos años, científicos a nivel mundial han tratado de entender los mecanismos y bases del proceso y desarrollo de estas asociaciones de microorganismos. Para su estudio han utilizado diversas herramientas como la utilización de la microscopía confocal mediante el acoplamiento de marcadores fluorescentes que permiten la visualización de las células vivas o muertas, así como su morfología; métodos moleculares como la hibridación *in situ*, el análisis comparativo de secuencias de DNA, ensayos de genes reporteros, PCR *in situ* (Hope *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 1997; Wimpenny *et al.*, 2000).

1.1.2. ETAPAS DE LOS BIOFILMS

Los biofilms se adhieren a superficies como los tejidos vivos, instrumentos médicos, tuberías de agua y a los sistemas acuáticos naturales como ríos y lagos (Donlan, 2002; Jenkinson y Lappin-Scott, 2000). Para que los biofilm se desarrollen se requiere de una serie de pasos altamente regulados por diversos factores ambientales, biológicos y físicos. Se sabe que el mecanismo genético-molecular de la formación de biofilm depende de cada microorganismo, pero las etapas del desarrollo del biofilm están conservadas entre una amplia gama de microbios (Figura

1.1). Estas etapas conforman un ciclo que incluyen la adhesión de las células a un sustrato, el crecimiento y agregación de las células en microcolonias, la maduración y el mantenimiento de la arquitectura del biofilm y la disgregación de células o subpoblaciones del biofilm (O'Toole *et al.*, 2000).

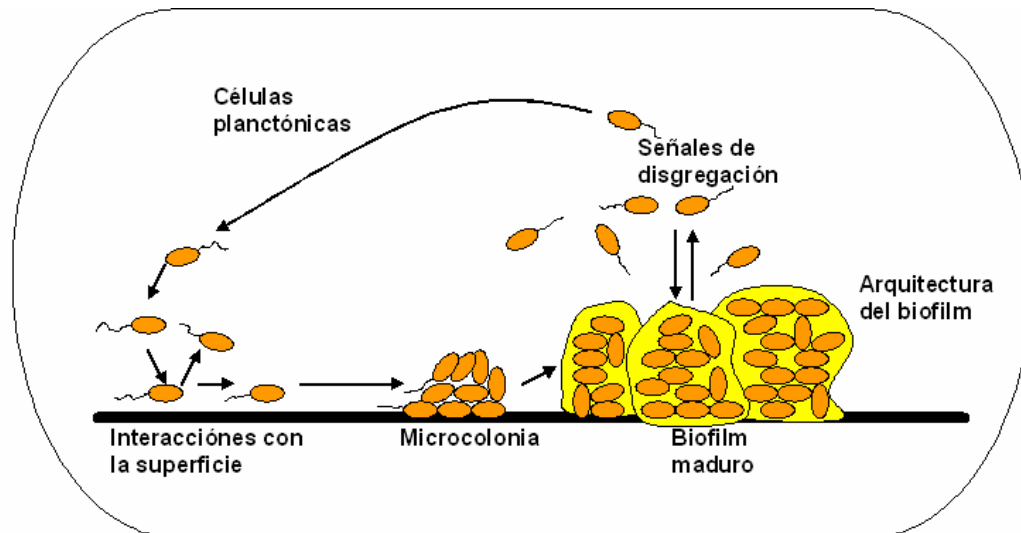


Figura 1.1. Etapas de desarrollo de las biocapas bacterianas.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema de estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además del agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (EPS) secretados por las propias células que forman parte del mismo. Los EPS junto con el agua forman del 50% al 90% del total de carbono orgánico de los biofilms. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, polímeros ricos en carbohidratos, lípidos, fosfolípidos, DNA, RNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Donlan, 2002; Petersen *et al.*, 2005; Sutherland, 2001), así como materiales no celulares como cristales de minerales, partículas corrosivas, arcillas o componentes de la sangre, que su presencia depende del ambiente donde se desarrolle el biofilm (Donlan, 2002). También los EPS se asocian con iones y cationes divalentes. Cabe mencionar que la matriz es un ambiente micro-heterogéneo por los innumerables micro-ambientes que co-existen dentro de él.

1.1.2.1. Adhesión

La interfase sólido-líquido que se encuentra entre la superficie y un medio acuoso (como agua o sangre) provee un ambiente ideal para la adhesión y crecimiento de microorganismos. La adhesión depende de la naturaleza de la superficie, ya que se ha observado que si es áspera la adhesión aumenta. También las propiedades fisicoquímicas de las superficies influyen en la velocidad y extensión del biofilm. Se ha visto que los microorganismos se adhieren rápido a superficies hidrofóbicas, a las superficies no polares como el Teflón y otros plásticos que a las superficies hidrofílicas como el vidrio o los metales (Donlan, 2002). Además se ha observado que las interacciones hidrofóbicas entre las superficies y los microorganismos hacen posible que se establezca una adhesión irreversible.

La adhesión se ve influenciada por el condicionamiento de la superficie ya que ésta se cubre de polímeros provenientes del medio que modifican químicamente a la superficie, un ejemplo de superficie condicionada es el esmalte de los dientes en la cavidad oral que es recubierta por albúmina, lisozimas, glicoproteínas, fosfoproteínas, lípidos y fluidos gingivales (Carlén *et al.*, 2003; Kolenbrander, 2000; Kolenbrander *et al.*, 2002). Estas superficies condicionadas se pueden encontrar en tejidos bañados por sangre, lágrimas, orina, saliva, fluidos intravasculares y secreciones respiratorias, que afectan la adhesión de las bacterias a las diversas superficies (Donlan 2002).

La velocidad del flujo adyacente a la interfase sustrato-líquido forma una barrera hidrodinámica y su grosor depende de la velocidad lineal; y la región afuera de esta barrera se caracteriza por ser turbulenta. Esta barrera hidrodinámica afecta las interacciones de las células con el sustrato, donde las células se comportan como partículas en el líquido y la velocidad de las asociaciones con la superficie sumergida depende en gran parte de las características y velocidad que lleva el líquido (Donlan, 2002). Esta hidrodinámica afecta el establecimiento y disgregación del biofilm.

Otras características que juegan un papel importante en la adhesión a las superficies son el pH, los niveles de los nutrientes, la fuerza iónica y la temperatura al igual que los parámetros climáticos, la presencia de cationes, y los niveles intracelulares de hierro (Banin *et al.*, 2005; Mey *et al.*, 2005).

También influyen en la adhesión de las células a las superficies la hidrofobicidad de las células debido a la presencia de fimbrias como los pilis y flagelos, así como a la producción de exopolisacáridos y otras proteínas de superficie como el antígeno O, las finas fibrillas poliméricas extracelulares y los LPS (Watnick *et al.*, 2001).

Los polisacáridos extracelulares han sido clasificados en polisacáridos capsulares y/o exopolisacáridos los cuales determinan la arquitectura del biofilm (Branda *et al.*, 2005). Dentro de estos polisacáridos se encuentran la celulosa componente de la matriz extracelular de *Gluconacetobacter xylinus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Zogaj *et al.*, 2001). El polisacárido llamado adhesina intracelular con siglas en inglés PIA de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* producido por la enzima codificada por el gen *ica*, tiene un equivalente en *E. coli* MG1655 llamado PGA codificado en los genes *pgaABCD* (Wang *et al.*, 2004), este polisacárido participa en la adhesión intercelular y en la desunión y dispersión de los biofilms en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *A. actinomycetemcomitans* (Kaplan, *et al.*, 2004). También el polisacárido extracelular llamado alginato que secreta *Pseudomonas aeruginosa* o los polímeros ricos en carbohidratos PEL (polímero rico en glucosa) y PSL (polímero rico en manosa) han sido involucrados en el desarrollo del biofilm (Friedman y Kolter, 2004).

Las fimbrias, proteínas y los EPS ayudan a la adhesión de las bacterias a superficies hidrofóbicas no polares, mientras que los LPS son útiles en la adherencia a superficies hidrofílicas. Además el flagelo es importante en la adhesión ya que su papel es superar las fuerzas repulsivas mas que actuar como absorbente o adhesivo (Donlan, 2002).

1.1.2.2. Microcolonias

Los biofilms no son capas de células depositadas acumulativamente, los biofilms son heterogéneos y contienen microcolonias de células bacterianas encapsuladas en una matriz de EPS separadas de otras microcolonias por los canales de agua donde fluye el medio permitiendo la difusión de nutrientes, oxígeno y otros agentes externos como agentes antimicrobianos.

1.1.2.3. Crecimiento

La arquitectura del biofilm es heterogénea en espacio y tiempo, ya que constantemente hay cambios internos e externos. Se ha visto que la motilidad genera la migración de las células de una microcolonia a otra, entonces la estructura de la microcolonia cambia, para hacerse más compacta.

1. 1. 2. 4. Maduración

Los gradientes de nutrientes, los productos de desecho y los factores de señalización, hacen que el biofilm sea heterogéneo. Los biofilms maduros muestran una estructura tridimensional compleja con numerosos microambientes que difieren en la osmolaridad, en el acceso a los nutrientes y en la densidad celular. La heterogeneidad produce una variedad de fenotipos dentro de los biofilms, por lo que no existe un fenotipo uniforme (Fux *et al.*, 2005). Además, en el interior de los biofilms las células exhiben un patrón de expresión genética diferente (Costerton *et al.*, 1999). Después de la adhesión las microcolonias maduran y se genera una matriz extracelular además de que se presenta una señalización dentro del biofilm, como en *Serratia liquefaciens* regulando la motilidad tipo “swarming” o de pupalar (Labbate *et al.*, 2004).

1.1.2.5. Disgregación

La disgregación del biofilm se da porque las nuevas células se desprenden del biofilm. Esto se da por los niveles de los nutrientes, por el “quórum sensing”, por efectos del flujo continuo del medio, por los cambios en lo niveles de oxígeno, de pH. También por la acción de enzimas que disgregan los componentes de la matriz como las polisacáridos liasas o las DNAsas (Boyd *et al.*, 1994), así como la motilidad esta involucrada en la dispersión de biofilm, resultando en la disolución de las microcolonias (Hall-Stoodley y Stoodley, 2005; Parsek *et al.*, 2004; Parsek y Greenberg, 2005).

La disgregación en los biofilms es importante ya que disemina infecciones y contamina los sistemas de agua. Esta disgregación se presenta como una erosión

continua de células y/o de pequeñas porciones del biofilm, y el rápido y súbito desprendimiento de biomasa del biofilm (Stoodley *et al.*, 2001).

En el biofilm maduro de la bacteria oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se ha observado que se requiere el polisacárido O de los lipopolisacáridos para la disgregación de las células, ya que involucra la formación de células no agregadas que se desprenden para formar nuevas microcolonias, permitiendo que el biofilm se disperse (Kaplan *et al.*, 2003a).

En los biofilms, particularmente dentro de las microcolonias de *P. aeruginosa*, se observó muerte de las células mediada por lisis de los fagos filamentosos Pf1, los cuales existe como profagos dentro del genoma (Webb *et al.*, 2003) o por la interacción de fagos externos al biofilm (Sutherland *et al.*, 2004). Otro determinante involucrado en la disgregación de los biofilms de *P. aeruginosa* es la presencia de los ramnolípidos los cuales, producen cavidades dentro de los biofilms generando que las células se desprendan (subpoblaciones) (Boles *et al.*, 2005) o que biofilms maduros de *Bordetella bronchiseptica* se disgreguen por la presencia ramnolípidos exógenos (Boles *et al.*, 2005; Irie *et al.*, 2005). También el biofilm de *P. aeruginosa* se dispersa por un incremento súbito de succinato, glutamato o glucosa, provocando que las células que se desprenden incrementen la expresión de flagelo (*fliC*) y disminuyan la expresión de pili (*pilA*) (Sauer *et al.*, 2004).

La dispersión del biofilm de una capa de *Streptococcus mutans* ocurre por la presencia de una proteína de superficie que se excreta llamada SPRE (Lee *et al.*, 1996). También en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* la dispersión del biofilm se presenta por la presencia de la proteína DspB, la cual también disgrega biofilms ya establecidos (Kaplan *et al.*, 2003b).

1.1.3. VENTAJAS ECOLÓGICAS DE VIVIR EN BIOFILM

En los ambientes naturales, las bacterias sobreviven en comunidades altamente organizadas, pueden formar floculos en suspensión, películas en la superficie de los líquidos y como tapete, pero los biofilms son las comunidades microbianas que se desarrollan en las interfases de sólidos-líquidos o en la interfase aire-líquido o en las interfases líquido-líquido (Macedo *et al.*, 2005; Spiers y Rainey, 2005). Por lo que posiblemente las bacterias adopten este estilo de vida en biofilm por las ventajas ecológicas que el nicho les proporciona, como la protección del medio ambiente, por

una mayor resistencia a diversos tipos de estrés y por la cooperación metabólica dentro del biofilm, soportan la falta de nutrientes, los cambios de pH, los radicales de oxígeno, resistencia a la fagocitosis (Costerton *et al.*, 1999; Jefferson, 2004; Lawrence *et al.*, 2004).

Las microcolonias son la estructura básica del biofilm, donde se crea un ambiente de gradientes de nutrientes, intercambio de genes y se establece un sistema de detección de densidad celular conocido como “quórum sensing” (ver sección 1.1.6.4). Cuando las microcolonias están compuestas de una mezcla de microorganismos, se llevan a cabo los ciclos de los nutrientes como el del nitrógeno, azufre y carbono, a través de reacciones redox que ocurren en los biofilms acuáticos y de los suelos, como es el caso de los estromatolitos que son estructuras sedimentarias compuestas principalmente de CaCO_3 , adheridas al sustrato, generadas por el producto de la actividad metabólica de microorganismos, que coexisten de manera natural en el ambiente como un biofilm, compuesto principalmente por cianobacterias, las cuales precipitan el carbono (Arp *et al.*, 2001).

Además los biofilms son un excelente nicho para el intercambio de DNA extracromosomal, el cual se presenta por la transferencia de genes mediante conjugación y transducción. Ghigo ha reportado que la presencia del pili conjugativo F en *E. coli* actúa como factor de adhesión de las células con células y de las células con la superficie (Ghigo, 2001).

1.1.4. IMPORTANCIA DE LOS BIOFILMS

La importancia del estudio de los biofilms radica en impacto tanto negativo como positivo que tiene en áreas como la medicina, la industria y el medio ambiente (O’Toole *et al.*, 2000; Stanley y Lazazzera, 2004; Watnick y Kolter, 2000).

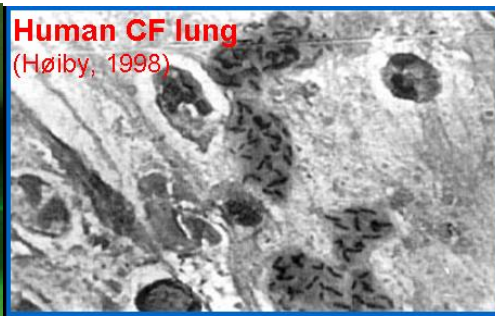
A**B**

Figura 1.2. **Ejemplos del impacto de los biofilms.** A) Obstrucción de oleoductos, B) biofilms formados por *P. aeruginosa* en pulmones de pacientes con fibrosis quística.

1.1.4.1. Importancia Industrial de los biofilms

Los biofilms son importantes para muchas actividades industriales ya que los biofilms reducen los desperdicios en masa, hay transporte de calor y se incrementa la corrosión de las tuberías. Para la industria alimenticia, la formación de biofilms se presenta sobre los alimentos y en los sistemas de agua potable, lo cual incrementa el riesgo de contaminación con microflora patógena. También la presencia de biofilms mixtos en los sistemas de agua ha sugerido que son una fuente de reserva y propagación de algunas enfermedades (Banning *et al.*, 2003; Doggett, 2000).

1.1.4.2. Importancia de los biofilms en la salud

Los microbiólogos clínicos reconocen que los biofilms son reservorios de algunos microorganismos patógenos ya que estos pueden estar en ambientes naturales o dentro del cuerpo humano (Hall-Stoodley y Stoodley, 2005). Los biofilms tienen un impacto en la medicina ya que se presentan en enfermedades como la fibrosis quística, la endocarditis, la otitis media, la periodontitis, la prostatitis, las caries dentales, y están asociados a infecciones en los implantes (Saint y Chenoweth, 2003). Aunado a eso los biofilms son tolerantes a agentes antimicrobianos a concentraciones de 10 a 1000 veces mayores que lo que se necesita para matar a las células en estado planctónico. Cabe señalar que los antibióticos aminoglicosídicos en concentraciones subinhibitorias inducen la formación de biofilm en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Hoffman *et al.*, 2005). También los biofilms son resistentes a la fagocitosis, lo que hace que sea difícil erradicarlos de los huéspedes. La estructura de la matriz extracelular del biofilm, hace que sean resistente a los

biocidas, debido a la composición de los exopolisacáridos, por la baja tasa de crecimiento, por la resistencia al estrés y por la presencia de bombas multidrogas (Fux *et al.*, 2005).

1.1.4.3. Importancia de los biofilm en el ambiente

La presencia de contaminantes xenobióticos (como los hidrocarburos y los metales pesados) causan en el ambiente grandes estragos, por lo que la biorremediación trata eliminar los contaminantes del ambiente. En los biofilms se lleva a cabo la biorremediación, esto se logra inmovilizando, acumulando, procesando, mineralizando y degradando los contaminantes del medio ambiente, por lo cual los biofilms se utilizan en los tratamientos de aguas residuales o de aguas contaminadas (Macedo *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006).

1.1.5. CLASES DE BIOFILMS

1.1.5.1. Mixtos

Los biofilms son grupos de microorganismo conformados de muchas especies bacterianas, de hongos, de algas, de virus y de protistas. Uno de las primeras comunidades asociadas a superficies estudiadas son las que se encuentran en la cavidad bucal de la cual se ha identificado los componentes estructurales de esta forma de vida, las interacciones entre las células y la comunicación celular (Esteves *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005). También se ha observado que los biofilms conformados de más de dos especies son más robustos (Filoche *et al.*, 2004).

1.1.5.2. Uniespecie

La estructura precisa, la química y fisiología de los biofilms varía con la naturaleza de las células bacterianas y del ambiente local. Para su estudio en el laboratorio se ha tratado de maximizar la reproducibilidad experimental por lo que la mayoría de los estudios se han realizado de una sola especie bacteriana.

1.1.6. FACTORES AMBIENTALES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL BIOFILM

1.1.6.1. Nutrientes

El flujo central de carbono y su regulación están involucrados en la formación de biofilm. Recientemente se reportó que la proteína CsrA (que se une a RNA) de *E. coli* se reprime la formación de biofilm y activa la dispersión. En algunos estudios se observó que la adición de glucosa al medio inhibe la formación de biofilm en *E. coli* K-12 MG1655, MC4100 y W3110 causando un decremento entre el 30 y 90% del biofilm, lo cual implica una represión catabólica mediada por el AMP cíclico y su proteína receptora CRP (Jackson *et al.*, 2002a).

Las células coordinan la expresión de los genes en respuesta a señales ambientales vía un selecto grupo de pequeñas moléculas, que incluyen a ppGpp, cAMP, leucina y el acetil fosfato (acP). La concentración intracelular del acP está involucrada en la expresión de estructuras celulares de superficie y en los procesos involucrados en las pasos iniciales de la formación de biofilm como en ácido colánico fimbria y pilis (Wolfe *et al.*, 2003).

1.1.6.2. pH

Muchas especies bacterianas, tienen un pequeño rango de pH para su crecimiento, su sobrevivencia depende de la heterogeneidad del biofilm, ya que las bacterias pueden modular su pH local, regulando genes que codifican para enzimas relacionadas con la producción de bases o ácidos (Stoodley *et al.*, 1997).

1.1.6.3. Oxígeno

Cuando las bacterias crecen adheridas a superficies presentan gradientes de oxígeno y condiciones locales de anaerobiosis. Por ejemplo, en biofilms maduros de *P. aeruginosa* la limitación de oxígeno y la presencia de nitrato reduce la susceptibilidad de antibióticos (Borriello *et al.*, 2004). La presencia de oxígeno se ha cuantificado por medio de micro electrodos, comprobando que en un biofilm de 210 μm de espesor el oxígeno penetra hasta una región de 50 μm y en las regiones del

biofilm por debajo de los 50 μm se genera un crecimiento lento o inanición por la limitación de oxígeno (Borriello *et al.*, 2004).

El hongo oportunista *Candida albicans* a pesar de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas su biofilm solo se forma en presencia de oxígeno (Biswas y Chaffin, 2005), por lo cual el oxígeno es un factor determinante en el establecimiento del biofilm de algunos microorganismos.

1.1.6.4. Quórum sensing

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Se ha demostrado que la formación de biofilm está regulada por el quórum sensing o autoinducción. El sistema de quórum sensing es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, el autoinductor, que permite a la bacteria detectar la densidad de población existente. En bacterias Gram-negativas el autoinductor (molécula señal) es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en el bacterias Gram-positivas el autoinductor son péptidos detectados mediante el sistema de dos componentes. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor este activa un receptor específico que altera la expresión de genes que afectan a distintos fenotipos como la virulencia, toma de DNA, esporulación, la producción de antibióticos, luminiscencia, motilidad, en la interacción con hospederos eucariontes (Bassler, 1999; Federle y Bassler, 2003; Zhang y Dong, 2004). El quórum sensing es usado por las bacterias que desarrollan un biofilm en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (Kievit *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2000). Por lo que el papel de las señales extracelulares y del quórum sensing es esencial para la diferenciación del biofilm y está involucrado en el establecimiento de las microcolonias, en la heterogeneidad, arquitectura, resistencia al estrés, en el mantenimiento y desprendimiento de células del biofilm que comprende la regulación de genes para la adhesión, motilidad, quimiotaxis, producción de EPS, en el crecimiento y competencia, en la toma y liberación de DNA (Davies *et al.*, 1998; Kjelleberg y Molin, 2002; Spoering y Gilmore, 2006). Consistentemente con estas observaciones se ha reportado que el alga australiana *Delisea pulchra* produce una furanona halogenada que interfiere con el quórum sensing mediado por acil homoserina lactonas, posiblemente al competir por

el sitio de unión de la homoserina en la proteína receptora; además los biofilms tratados con dicha furanona son incapaces de madurar, se afecta la arquitectura y promueve la desunión de bacterias del biofilm con la consecuente pérdida de biomasa (Hentzer *et al.*, 2002).

En *P. aeruginosa* existen dos sistemas de comunicación celular, *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI* involucrados en la formación de biofilm. A una densidad de población suficiente las señales se acumulan y se alcanza la concentración necesaria para la activación de genes involucrados en la diferenciación del biofilm, mutantes incapaces de secretar estas señales forman un biofilm distinto en la arquitectura.

1.1.7. FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL BIOFILM

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación de biofilm. La activación de la síntesis de celulosa en *S. enterica* serovar *Typhimurium* se produce por el activador alostérico c-diGMP. La concentración de este activador depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL. En *P. aeruginosa* hay gran un número de genes involucrado en la formación del biofilm como el gen *wspF* que presenta el dominio GGDEF el cual está involucrado en generar un biofilm menos robusto y grueso que el tipo silvestre, lo que indica que la presencia de c-diGMP es necesaria para la formación de biofilm (Hickman *et al.*, 2005). Un tratamiento con c-diGMP extracelular en *Staphylococcus aureus* inhibe las interacciones intracelulares y la formación de biofilm (Karaolis *et al.*, 2005). El c-diGMP está involucrado en diversos procesos de diferenciación celular y en mecanismos de multicelularidad en bacterias, como el proceso de la motilidad, virulencia, resistencia a metales, niveles de competitividad, comunicación célula-célula, en la morfología de la célula, en la síntesis de fimbria, en la producción de celulosa, en la vida libre y en los diferentes pasos del biofilm (García *et al.*, 2004; Méndez-Ortiz *et al.*, 2006; Romling *et al.*, 2005; Römling y Amikam, 2006; Simm *et al.*, 2004). También el c-di-GMP regula la expresión de genes involucrados en la expresión exopolisacaridos controlando la estabilidad de los biofilms (Thormann *et al.*, 2006).

1.1.8. Genes involucrados

Estudios genéticos han ayudado a definir los genes que participan en la diferenciación de los estadios de la formación de biofilm. Los genes requeridos para la formación de biofilm son los relacionados con la adhesión, el quórum sensing, con la pared celular, con el metabolismo y con plásmidos (Jefferson, 2004) y por otro lado están los genes que se expresan en biofilm a diferencia de las células planctónicas o células que se desprenden del biofilm, que son los relacionados a adhesión, quórum sensing, respuesta al estrés, metabolismo de los carbohidratos, de la división celular, la motilidad y de los fagos (Sauer *et al.*, 2004).

Tabla 1.1. Genes que codifican proteínas involucradas en la formación de biofilm.

Gen	Función (Producto)	Organismo	Referencia
<i>aafA</i>	Participa en adherencia agregativa (AafA, subunidad de AAF/II)	<i>E. coli</i> EAEC	Czeczulin <i>et al.</i> , 1997.
<i>aggR</i>	Activador transcripcional de AAF/II que afecta la formación de biofilm (AggR)	<i>E. coli</i> EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001.
<i>agn43 (flu)</i>	Media interacciones célula-célula y célula-superficie en medio mínimo suplementado con glucosa (Ag43, antígeno 43)	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000a.
<i>bhsA</i>	La delección de este gen induce el aumento de formación de biofilm por respuesta al estrés y por cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular (BhsA)	<i>E. coli</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007.
<i>bolA</i>	La sobreexpresión de este gen induce la formación biofilm y la delección la disminuye (morfogene para célula redonda, BolA)	<i>E. coli</i>	Vieira <i>et al.</i> , 2004
<i>cpsE</i>	Participa en síntesis de ácido colánico	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2000.
<i>cpxR</i>	Monitorea biogénesis de pili F, pili P y curli (Sistema de dos componentes CpxRA, de estrés extracelular)	<i>E. coli</i>	Dorel <i>et al.</i> , 2006 Otto y Silhavy, 2002.
<i>csgA</i>	Participa en interacciones celulares con la superficie y con otras células (Curlina, subunidad estructural del curli)	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret, <i>et al.</i> , 2000.
<i>csgD</i>	Regulador transcripcional de curli (CsgD)	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2001.
<i>csrA</i>	Represor de la formación de biofilm y activador de la dispersión del mismo (CsrA, regulador global de unión a RNA)	<i>E. coli</i>	Jackson <i>et al.</i> , 2002b.
<i>cysE</i>	Mutantes en este gen forman biofilm mas rápido comparado con la cepa silvestre (Enzima que convierte la serina en O-acetil-L-serina)	<i>E. coli</i>	Sturgill <i>et al.</i> , 2004.
<i>dsbA</i>	Participa en el plegamiento de proteínas extracitoplásmicas que contienen puentes	<i>E. coli</i>	Genevaux <i>et al.</i> , 1999a.

Gen	Función (Producto)	Organismo	Referencia
	disulfuro y en ensamblaje de fimbria tipo I y del cuerpo basal del flagelo (DsbA)		
Grupo <i>fim</i>	Media interacciones célula-célula y célula superficie (pili tipo I)	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998.
<i>fis</i>	Activa la expresión de AggR (Fis)	<i>E. coli</i> EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001.
<i>flhD</i>	Regulador maestro de síntesis de flagelo involucrado en la adhesión reversible (FlhDC)	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998.
<i>fliC</i>	Subunidad estructural del flagelo (Flagelina)	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998.
<i>nhaR</i>	Activador transcripcional de <i>pgaABCD</i> , regulando la producción de la adhesina PGA requerida para la formación de biofilm	<i>E. coli</i>	Goller <i>et al.</i> , 2006.
<i>hha</i> , <i>ybaJ</i> , <i>ompA</i>	Participan en la formación de biofilm, en la motilidad, en conjugación y agregación (Hha, YbaJ y OmpA)	<i>E. coli</i>	Barrios <i>et al.</i> , 2005.
<i>nlpE</i>	Posiblemente transmite señales al dominio periplásmico de CpxA en respuesta a daño en membrana causado al momento de adhesión (Lipoproteína de membrana externa)	<i>E. coli</i>	Otto y Silhavy, 2002.
<i>ompR234</i>	Mutantes en este gen estimulan la formación de biofilm vía producción de curli (OmpR, parte del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR que responde a osmolaridad)	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2001.
<i>oxyR</i>	La forma reducida de OxyR reprime la expresión del gen <i>flu</i> (OxyR, regulador maestro durante estrés oxidativo)	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000a; Schembri <i>et al.</i> , 2003.
<i>pgaABCD</i>	Promueve la adhesión intercelular y a las superficies en la formación de biofilm (Adhesina tipo polisacárido, PGA)	<i>E. coli</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004.
<i>rfaG</i> , <i>rfaP</i> , <i>galU</i>	Mutantes en estos genes están afectadas en motilidad y fimbria tipo I (Participan en la biosíntesis del "core" de LPS)	<i>E. coli</i>	Genevaux <i>et al.</i> , 1999b.
<i>rfaH</i>	Reprime la formación de biofilm por la reducción de la adhesión (RfaH, antiterminador transcripcional)	<i>E. coli</i>	Beloin <i>et al.</i> , 2006.
<i>rpoS</i>	Factor sigma de fase estacionaria (RpoS)	<i>E. coli</i>	Adams y McClean, 1999. Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a. Whiteley <i>et al.</i> , 2001.
<i>relA</i> , <i>spoT</i>	Mutantes en estos genes presentan un decremento en la formación de biofilm en medio mínimo (Biogénesis de (p)ppGpp)	<i>E. coli</i>	Balzer y McLean, 2002.
<i>tnaA</i>	Participa en la formación de biofilm y adherencia a células epiteliales (Tryptofanasa)	<i>E. coli</i>	Di Martino <i>et al.</i> , 2002.
<i>wcaF</i>	Participa en la producción de ácido colánico.	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000b.
<i>yafK</i>	Proteína hipotética, posiblemente regula los genes que codifican AAF/II a nivel transcripcional (YafK)	<i>E. coli</i> EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001.
<i>dspB</i>	Participa en disgregación del biofilm (N-acetilglucosaminidasa)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Kaplan <i>et al.</i> , 2003b.
<i>sinR</i>	Regula la transición entre células planctónicas a biofilm (SinR, regulador maestro)	<i>Bacillus subtilis</i>	Kearns <i>et al.</i> , 2005.

Gen	Función (Producto)	Organismo	Referencia
<i>bvgA</i>	Mutantes en este gen disminuyen la formación de biofilm (BvgAS, sistema de transducción de señales)	<i>Bordetella</i> sp.	Mishra <i>et al.</i> , 2005.
<i>cepl/cepR</i>	Participa en el control de la maduración del biofilm (Sistema de quórum sensing)	<i>Burkholderia cepacia</i>	Huber <i>et al.</i> , 2001.
<i>esal/esaR</i>	Regula la adhesión y formación de biofilm (Esal/EsaR sistema quórum sensing)	<i>Pantoea stewartii</i>	Koutsoudis <i>et al.</i> , 2006.
<i>algL</i>	Degrada alginato, participa en disgregación del biofilm (Alginato liasa)	<i>P. aeruginosa</i>	Boyd y Chakrabarty, 1994.
<i>algT</i>	Regula síntesis de alginato (AlgT)	<i>P. aeruginosa</i>	Hentzer <i>et al.</i> , 2001
<i>flgK</i>	Proteína flagelar asociada al gancho	<i>P. aeruginosa</i>	O'Toole y Kolter, 1998a.
<i>katAB</i>	Dan protección contra el peróxido de hidrógeno en biofilm (Catalasas)	<i>P. aeruginosa</i>	Elkins <i>et al.</i> , 1999.
<i>lasI</i>	Regulación de biofilm vía quórum sensing (LasI) <i>N</i> -(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona	<i>P. aeruginosa</i>	Davies <i>et al.</i> , 1998.
<i>lon</i>	Proteasa esencial en la formación de biofilm y motilidad (Lon)	<i>P. aeruginosa</i>	Marr <i>et al.</i> , 2007.
<i>mucA22</i>	Mutantes en este gen sobreproducen alginato (Factor anti-sigma de <i>algT</i>)	<i>P. aeruginosa</i>	Hentzer <i>et al.</i> , 2001.
Grupo <i>pel</i>	Son responsables de la producción de matriz extracelular rica en glucosa en la formación de biofilm (Proteínas transmembrana y de procesamiento de carbohidratos)	<i>P. aeruginosa</i>	Friedman y Kolter, 2004.
<i>pilBCD</i>	Síntesis de pili tipo IV (PilB, PilC, PilD)	<i>P. aeruginosa</i>	O'Toole y Kolter, 1998a.
<i>wspF</i>	Mutantes en este gen aumentan la formación de biofilm por un incremento de c-diGMP (operon <i>wsp</i> , parte del sistema de traducción de señales)	<i>P. aeruginosa</i>	Hickman <i>et al.</i> , 2005.
<i>agfA</i>	Estabiliza el contacto intracelular y participa en adhesión a superficies (AgfA, subunidad de fimbria SEF17)	<i>S. enteritidis</i>	Austin <i>et al.</i> , 1998.
<i>fap1</i>	Participa en biogénesis de fimbrias (Fap1, adhesina asociada a fimbria)	<i>S. parasanguis</i>	Froeliger y Fives-Taylor, 2001.
<i>sarA</i>	Mutantes en este gen inhiben la formación de biofilm vía la regulación de polisacáridos PIA/PNAG (SarA, regulador central)	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. epidermidis.</i>	Valle <i>et al.</i> , 2003; Tormo <i>et al.</i> , 2005
<i>sigB</i>	Participa en la inducción de biofilm bajo estrés osmótico (Factor sigma σ^B)	<i>S. aureus</i>	Rachid <i>et al.</i> , 2000.
<i>rbf</i>	Involucrado en la agregación multicelular dentro del biofilm que responde a glucosa y NaCl (Regulador transcripcional Rbf)	<i>S. aureus</i>	Lim, <i>et al.</i> , 2004.
<i>comCDEX</i>	Mutantes en estos genes presentan un biofilm anormal (ComCDEX, sistema quórum sensing en Gram-positiva)	<i>Streptococcus mutans</i>	Li <i>et al.</i> , 2002.
<i>Smu0630</i>	Mutante en este gen disminuye la formación de biofilm a pesar de la fuente de carbono (Smu3630, posible lipoproteína de unión a glucano)	<i>S. mutans</i>	Brown <i>et al.</i> , 2005.
<i>luxO</i> , <i>hapR</i>	Mutantes en estos genes disminuyen la formación de biofilm (LuxO, HapR, sistema quórum sensing)	<i>Vibrio cholerae</i>	Zhun y Mekalanos, 2003.

Gen	Función (Producto)	Organismo	Referencia
<i>mbaA</i>	Participa en la formación y mantenimiento de la arquitectura tridimensional del biofilm maduro (MbaA)	<i>V. cholerae</i>	Bomchil <i>et al.</i> , 2003.
<i>ryhB</i>	Mutantes en este gen presentan un biofilm diferente a la cepa silvestre y una reducción en motilidad y quimiotaxis en bajo hierro (Pequeño RNA; regulador)	<i>V. cholerae</i>	Mey <i>et al.</i> , 2005.

1.1.9. Proteomas de los biofilms

El patrón de expresión genética de las células en biofilm difiere de aquel observado en células de vida libre o planctónicas (Donlan, 2002).

Los biofilms han sido investigados para dilucidar los mecanismos genéticos de su regulación. Por medio de estudios sobre la comparación de la expresión de los genes y patrones de proteínas entre las células planctónicas y durante el desarrollo del biofilm se ha encontrado la represión de genes flagelares y una hiper expresión de genes para la adhesión y de proteínas ribosomales (Lazazzera, 2005). Dentro del biofilm se generan microambientes y en cada región hay una diferenciación donde se expresa un patrón diferente de genes, esta expresión diferencial responde a señales intracelulares o extracelulares. En *E. coli* el análisis de los cambios en la expresión de genes de células planctónicas y en biofilm indicó que las proteínas involucradas en la adhesión aumentaron en las células en biofilm, así como las proteínas de transporte, posibles oxidoreductasas y genes asociados con el aumento a la resistencia a metales pesados (Schembri *et al.*, 2003).

En el análisis del microarreglo de *P. aeruginosa* se detectó que el 1% de los genes es expresado diferencialmente en biofilm con un 0.5% activado y un 0.5% reprimido. Los genes están involucrados en la resistencia a antibióticos, motilidad, adhesión, traducción, metabolismo, transporte y aquellos presentes en algunos profagos son los mas activados (Whiteley *et al.*, 2001).

En general los datos muestran una expresión de genes diferencial que involucra al metabolismo anaeróbico, la regulación de la permeabilidad de la membrana, la producción de polímeros extracelulares, la motilidad y los genes sin función asignada son los mas activados en biofilm (Beloin *et al.*, 2004). En un estudio en el cual se realizó una comparación de la expresión de genes de *Staphylococcus aureus* entre las fases exponencial y estacionaria contra la de

biofilm maduro se encontró que 48 genes incrementaron su expresión en el biofilm mientras que 84 genes fueron reprimidos en estado planctónico (Beenken *et al.*, 2004) dichos genes están involucrados en la adaptación al cambios de pH y crecimiento en anaerobiosis.

Con la proteómica se completa el estudio del análisis transcripcional ya que se detectan proteínas, después de una regulación post traduccional, la cual no se logra predecir por medio de los microarreglos. Aunque no son muchos los estudios sobre la expresión de proteínas en biofilm, en *E. coli* O157:H7 se han identificado algunas de las proteínas posiblemente involucradas en el fenotipo de las células en biofilm (Tremoulet, *et al.*, 2002). En este trabajo la detección de las proteínas con diferente expresión en células en biofilm y células planctónicas se llevó a cabo utilizando geles de doble dimensión, posteriormente estas proteínas se identificaron mediante MALDI-TOF-MS. Utilizando esta metodología se identificaron 14 proteínas cuya síntesis estaba incrementada en las células del biofilm y 3 cuya síntesis se reprimía en las células del biofilm y las agruparon en (1) proteínas del metabolismo general (malato dehidrogenas, tiamina-fosfato pirofosforilasa, (2) proteínas de transporte de azúcares y amino ácidos (D-ribosa- proteína de periplasma, D-galactosa- proteína, YBEJ), (3) proteínas regulatorias (conservación del DNA y tipo H-NS) y (4) las de función desconocida (Tremoulet *et al.*, 2002). Recientemente se comparó los proteomas de *E. coli* S17-1 contra una mutante en el gen *tnaA*, el cual participa como una señal extracelular que regula la formación de biofilm (Collet *et al.*, 2007).

Un gran número de proteínas se producen diferencialmente durante cada estadio del biofilm de *P. aeruginosa* y *B. cereus* a comparación con las células planctónicas, esta proteínas tienen que ver con el daño oxidativo, producción de exopolimeros, con el metabolismos aeróbico y anaeróbico y con en transporte membranal (Sauer *et al.*, 2002; Oosthuizen *et al.*, 2002)

1.2. *Escherichia coli* COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y/O DISGREGACIÓN DE BIOFILMS

1.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa la cual es la más estudiada de la familia Enterobacteriaceae, ya que cepas derivadas de *E. coli* K-12 han sido investigadas en muchos laboratorios del mundo. Con su estudio, se han descrito diversos procesos metabólicos y fisiológicos, así como muchas de las bases de la genética. Además, este microorganismo es parte de la flora intestinal bacteriana de diversos mamíferos, aunque también tiene la capacidad de vivir fuera del hospedero y causar enfermedades clínicas (Dougan *et al.*, 2001). Además de la fácil manipulación de este organismo en condiciones de laboratorio, existen muchas herramientas genéticas y se dispone de la secuencia completa de su genoma.

La secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12 MG1655 fue reportada en 1997 por Blattner y colaboradores (Blattner *et al.*, 1997). Su genoma de doble cadena de DNA circular, contiene aproximadamente 4 639 221 pb, con 4401 genes que codifican para 116 RNAs no traducidos y 4285 proteínas, de las cuales sólo se han caracterizado alrededor del 50% y aproximadamente un 20% de ellas no tiene función asignada (Dougan *et al.*, 2001; Serres *et al.*, 2001). También se determinó la secuencia del genoma de *E. coli* K-12 W3110 (Yura *et al.*, 1992), y de *E. coli* O157:H7 (Perna *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que *E. coli* también ha adquirido genes mediante elementos extracromosomales como los plásmidos. Estos plásmidos están asociados a ciertos fenotipos, como la resistencia a antibióticos, y otros no tienen una función reconocida (Dougan *et al.*, 2001).

E. coli O157:H7 es un patógeno humano identificado en colitis hemorrágicas en 1982, coloniza los intestinos y causa diarrea con descargas de sangre y contamina diversas hortalizas. Esta bacteria expresa diferentes fimbrias y adhesinas involucradas en la adhesión a superficies. *E. coli* enterotoxigenicas (ETEC) producen toxinas que causan la diarrea.

1.2.1.1. Estudios de la formación de biofilms en *E. coli*

Los episodios de la formación de biofilm de *E. coli* consisten en 1) una adhesión inicial reversible al medio sólido de las células planctónicas mediada por el fluido del sistema o por la motilidad, 2) la transición de la adhesión reversible a una irreversible mediada por la producción de polímeros extracelulares de la bacteria y de adhesinas localizadas en la superficies de las células como las fimbrias y pilis, 3) el desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm, 4) el desarrollo de las microcolonias a un biofilm maduro, donde se observa una arquitectura compleja como de pedestales, con canales de agua y poros, en el cual se desarrollan patrones específicos de crecimiento y donde la fisiología y metabolismo es diferente al observado en las células planctónicas y 5) la dispersión de las células del biofilm que regresan al ambiente planctónico (Van Houdt y Michiels, 2005). Este patrón de dispersión se da por la liberación de células o de grupos de células mediada por moléculas de señalización como las acil homoserin lactonas (AHLs) que secretan las bacterias Gram-negativas o por péptido específicos que secretan las bacterias Gram-positivas.

En *E. coli*, las AHLs no están directamente involucradas en la formación de biofilm, porque este organismo es incapaz de producirlas. *E. coli*, produce una proteína receptora SdiA, que es similar al tipo del activador transcripcional LuxR dependiente de las AHLs en el quórum sensing (Ahmer, 2004).

Numerosas cepas de *E. coli* producen el autoinductor-2 (AI-2) el cual se presenta en Gram-negativas y Gram-positivas y que depende del producto del gene *luxS* para su síntesis. AI-2 esta involucrado en múltiples funciones de *E. coli* como la división celular, el metabolismo, la virulencia, secreción tipo III, la producción de flagelo y la motilidad, la cual influye en la formación de biofilm (De Lisa *et al.*, 2001; Federle y Bassler, 2003) AI-2 permite a los microorganismos sensor y responder a células de diferentes especies, esta señalización interespecie se puede presentar en *E. coli* enteropatógenicas (Sperandio *et al.*, 1999).

1.2.1.2. Cuantificación de la formación de biofilm mediante el método de tinción por cristal violeta

En muchos estudios, la formación de biofilm ha sido cuantificada por la técnica de cristal violeta en el cual se tiñen las células en placas de microtitulación (Pratt y Kolter, 1998). La formación de biofilm en pozos de PVC se estima por la medida de la absorbancia del cristal violeta que se adhirió a las células que formaron el biofilm. Se ha demostrado que existe una relación entre el número de células que forman el biofilm con la absorbancia a 590 nm del cristal violeta (Narisawa *et al.*, 2005).

1.2.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL BIOFILM FORMADO POR *E. COLI*

1.2.2.1 Ácido colánico

El ácido colánico o antígeno M es un polisacárido extracelular producido por la mayoría de las *E. coli* cuando se adhiere a superficies abióticas y codificado en los genes *wca*. Aparentemente el ácido colánico no es necesario para la adhesión inicial, pero sí para el establecimiento de la estructura tridimensional o madura del biofilm (tercera etapa) (Danese *et al.*, 2000b; Prigent-Combaret *et al.*, 2000).

1.2.2.2. Fimbrias

La más común de las adhesinas encontradas en *E. coli* son las fimbrias tipo 1, que se codifican en el cluster de genes *fim*. Mutantes en *fim* no presentan adhesión a superficies abióticas como el PVC cuando crecen en cultivos estáticos y en medios ricos (Pratt y Kolter, 1998). Un incremento en la expresión del cluster de *fim* fue observado en biofilms crecidos en medio mínimo (Ren *et al.*, 2004) lo que sugiere que es necesario para la adhesión inicial a superficies.

Además de las interacciones físicas entre la fimbria tipo 1 y la superficies sólida se presentan cambios en la estructura de la membrana externa en la expresión de proteínas de la membrana (Otto *et al.*, 2001). Además de la fimbria tipo 1, *E. coli* produce otras fimbrias que son clasificadas en base a su adhesividad, propiedades físicas o antigénicas. Se conocen en *E. coli* enteroagregativas dos tipos

de fimbrias AAF/I y AAF/II; la fimbria tipo 4 designada como pili (BFP) involucrada en la autoagregación y en la formación de biofilm (Sheik *et al.*, 2001).

1.2.2.3. Proteínas de autotransporte

Las proteínas de autotransporte son proteínas secretorias localizadas en la membrana externa que conforman el mecanismo de autotransporte tipo V, que en *E. coli* se conocen como Ag43, AIDA y TibA. El antígeno 43 (Ag43) es una proteína de superficie de *E. coli* (con alrededor de 50 000 copias) codificado en el gene *flu* es considerada como adhesina localizada en la membrana externa, establece autoagregación entre las células y promueve la formación de biofilm mediante la inducción de las microcolonias (Danese *et al.*, 2000a; Schembri y Klemm, 2001). La adhesina involucrada en la adherencia difusiva (AIDA) es una proteína de autotransporte producida por *E. coli* causantes de diarrea la cual es glicosilada y se adhiere a células epiteliales, que media el aumento de la formación de biofilm y la autoagregación (Sherlock *et al.*, 2004). El gen *tibA*, localizado en el locus *tibDBCA*, codifica para un autotransportador que es una proteína glicosilada y que confiere propiedades adhesivas a *E. coli* aumentando la formación de biofilm a superficies abióticas, así como su autoagregación (Sherlock *et al.*, 2005).

1.2.2.4. Celulosa

La producción de celulosa se da en especies bacterianas como *E. coli* y *S. typhimurium* y es conocido como el morfotipo multicelular rdar. La celulosa es una cadena lineal (1→ 4)-β de glucosa, es el segundo componente de la matriz extracelular y la co-expresión de la celulosa con las fimbrias agregativas permite la formación de una red altamente hidrofóbica con células alineadas paralelamente en la matriz. La expresión de los componentes del morfotipo rdar pueden ser fácilmente observadas por la absorción del colorante rojo Congo, la expresión de pequeñas fimbrias agregativas permite la coloración de la colonia al color café o bdar morfotipo, mientras que la expresión de celulosa permite la coloración de la colonia rosa o pdar morfotipo que también unen calcoflúor que detecta polisacáridos con (1→ 3)-β y (1→ 4)-β-D-glucopiranosil (Zogaj *et al.*, 2001).

1.2.2.5. Curli

Los curlis son apéndices filamentosos de naturaleza proteínica involucrados en la formación de biofilm por promover la adhesión inicial y la interacción entre células en *E. coli*. Los genes necesarios para la producción de curli son *csgBA* y *csgDEFG* (Brombacher *et al.*, 2003). Una sobreexpresión de curli en *E. coli* K-12 provoca un desarrollo y diferenciación del biofilm mediante la adhesión a superficies (Vidal *et al.*, 1998).

1.2.2.6. Flagelo y motilidad

E. coli es mótil debido a la presencia de flagelos peritricos, que le permiten llevar a cabo los procesos de quimiotaxis y que están involucrados en la formación de biofilm (Pratt y Kolter, 1998). La motilidad mediada por flagelo es abolida por mutaciones en los genes *fliC* (que codifica para la flagelina) y *flhDC* (que codifica para el regulador maestro de todo el regulón del flagelo). También la remoción del gen *motA* (que codifica para el motor de la rotación del flagelo) impide la motilidad. La delección de los genes de la quimiotaxis *cheA* y *cheZ* resulta en células móviles pero éstas no hacen quimiotaxis lo cual permite la formación de biofilm (Pratt y Kolter, 1998). Además de que el flagelo permite la interacción inicial de la célula con a superficie, el flagelo juega un papel en la dispersión del biofilm, ya que la expresión de *csrA* (que codifica para un regulador del almacenamiento del carbono) fluctúa dinámicamente durante la formación de biofilm ya que actúa como represor de la formación del biofilm y como activador de la dispersión del biofilm ya que tienen un efecto en la regulación post-transcripcional de la expresión de los mRNA de *flhC* (Jackson *et al.*, 2002a). Las diferencias en la motilidad se deben a la diferencia en la expresión de los loci de motilidad *qseB*, *flhD*, *fliA*, *fliC* y *motA*, lo cual afecta la arquitectura del biofilm (Wood *et al.*, 2005).

1.2.3. ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN *E. COLI*

Para entender la biología de las biocapas bacterianas se recurre al uso de diversas herramientas de la biología molecular, como han sido la obtención y caracterización de bancos de mutantes. Con esto se ha mostrado cómo las bacterias mutadas cambian su fenotipo al formar el biofilm y con esto se ha podido dilucidar los genes que participan en la formación de biofilm. Cabe señalar que dentro de estas comunidades aparte de darse una comunicación célula-célula por medio de señales integrales del quórum sensing, también se reciben señales extracelulares provenientes del ambiente como son los factores físicos y químicos. Esta interacción con el medio que rodea a la comunidad bacteriana y con las células que forman el biofilm, inicia una respuesta de las células activando cascadas de señalización, que van a regular cada paso de la formación de la biocapa por medio de la regulación de la expresión de genes.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con la bacteria *E. coli*, se reportó que el uso que medio suplementado con 100 mM de MOPS (3-N-morfolino propano sulfonato), mantiene el pH del medio con mínimas variaciones hasta por 60 horas y favorece el establecimiento del biofilm en ensayos utilizando el método de Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, (2000). Además se mostró evidencia que la cepa W3110 de *E. coli* K-12 solo forma biofilm bajo condiciones aeróbicas. Asimismo, no se encontraron moléculas extracelulares provenientes de condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas que pudieran estar influyendo en la formación de biofilm en esta condición de crecimiento, proponiéndose que el oxígeno juega un papel importante en la formación del biofilm (Colón-González *et al.*, 2004; Bokranz, *et al.*, 2005). También se ha reportado diversos factores genéticos que afectan y promueven el desarrollo del biofilm. Como ejemplo de estos, se ha observado que la proteína RpoS (que representa uno de los factores sigma alternativo de la RNA polimerasa) participa en el control de la cantidad de biofilm formado, así como en determinar su iniciación y en la prevención de la síntesis de un factor extracelular que aparentemente promueve la formación de biofilm durante la fase exponencial de crecimiento (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernandez, 2002).

Estudios sobre formación de biofilm en *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* han mostrado que el biofilm se forma como un anillo en la interfase aire-medio o neustón (O'Toole *et al.*, 1999; Spiers y Rainey, 2005; Watnick y Kolter,

2000; Watnick *et al.*, 2001), estos datos sugieren que el oxígeno juega un papel importante en este proceso. El requerimiento del oxígeno en la formación de biofilm, puede entenderse cuando se trata de organismos aeróbicos, ya que es fácil pensar que si estos organismos requieren oxígeno para el funcionamiento de su metabolismo, entonces también lo requerirán para formar biofilm. Sin embargo, en *E. coli*, la formación de biofilm ocurre únicamente en presencia de oxígeno, hecho que resulta interesante dado que *E. coli* es un organismo facultativo, es decir, puede crecer en presencia de oxígeno y en ausencia de este puede llevar a cabo la respiración anaeróbica utilizando aceptores de electrones alternos al oxígeno y aún en ausencia de estos últimos, puede realizar el metabolismo fermentativo (Böck y Sawers, 1996).

1.3. Objetivo de ésta tesis

El objetivo principal del presente trabajo fue ampliar el conocimiento de los factores que influyen en la formación y/o disgregación de los biofilms bacterianos en *E. coli*, analizando el papel de señales extracelulares y genes propios de la especie. En especial enfocándonos en el papel del oxígeno en la formación de biofilms.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS

2.1.1. Cepas de laboratorio

Tabla 2.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepas	Propiedades relevantes del genotipo	Referencia
CF1648	MG1655 F- <i>lam- rph-1</i> (prototrofa)	Colección del laboratorio
W3110	F- <i>lam-In(rrnD-rrnE) 1 rph-1</i>	Genetic Stock Center
MC4100	F- <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 flb-5301 deoC1 pts F25</i>	Michael Casadaban
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	Colección del laboratorio
XL1-Blue	F' <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i>	Stratagene
TOB1	Aislado fecal	Ute Römling
ZK408	<i>filhC araD ΔlacU169 strA thi pyrC64 nsIA his</i>	Roberto Kolter
JMH1814 (mutante No. 12)	MG1655 mutante seleccionada por inserción de EZ-Tn5 TM <T7/KAN-2> (Kan ^R) que tiene un biofilm con mas biomasa a las 52 h	Este trabajo
JMH1819 (mutante No. 17)	MG1655 mutante seleccionada por inserción de EZ-Tn5 TM <T7/KAN-2> (Kan ^R) que tiene un biofilm con mas biomasa a las 52 h	Este trabajo

2.1.2. Cepas ambientales

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron aisladas de diferentes fuentes ambientales y se enlistan en las Tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4.

2.1.3. Bacteriófagos utilizados en este trabajo

Tabla 2.2. Bacteriófagos

Bacteriófagos	Referencia
P _{1vir}	Miller, 1992.
λ NK1105 (λ miniTn5)	Kleckner <i>et al.</i> , 1991.
λ NK1098 (λ miniTn10)	Kleckner <i>et al.</i> , 1991.

2.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS

Todas las cepas analizadas en este estudio fueron sembradas en medio Luria-Bertani (LB) (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%), para su

conservación se elaboró un stock de cada cepa en LB-glicerol al 60-40% respectivamente que se congelo a -80°C.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1. Medios de cultivo y condiciones aeróbicas

Los medios de cultivos utilizados fueron LB, medio LB suplementado con MOPS (3-*N*-morfolino propano sulfonato) 100 mM (O'Toole *et al.*, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b) a pH 7.0, LB MOPS 100 mM adicionado con glucosa 0.2%, LB MOPS 100 mM adicionado con nitrato de sodio 1 mM, LB MOPS 100 mM adicionado con glucosa 0.2% y nitrato de sodio al 1 mM, medio mínimo M63B1 (medio M63 adicionado con biotina, Miller, 1992), medio mínimo M63B1 adicionado con MOPS 100 mM y medio mínimo M63B1 adicionado con MOPS 100 mM y glucosa 0.2%. La condición aeróbica fue generada en toppers de una capacidad de dos litros (L).

2.3.2. Medios de cultivo y condiciones anaeróbicas

Los medios de cultivos utilizados fueron los mismos que para las condiciones aeróbicas. Las condiciones anaeróbicas fueron generada en jarras de anaerobiosis, utilizando el sistema anaeróbico BBL™ GasPak™ (BBL Microbiology Systems), que genera una atmósfera compuesta por hidrógeno y dióxido de carbono. También se utilizó una cámara (Anaerobic Chamber by PLAS □ LABS, Lansing, MI, USA) que mantiene la anaerobiosis por la inyección de una mezcla de gases de H₂ 10%, CO₂ 5% y N₂ 85%.

2.4. ANTIBIÓTICOS Y SUPLEMENTOS UTILIZADOS

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración en membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm y adicionados al medio a menos de 50°C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200 µg/ml, cloramfenicol 25 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y tetraciclina 25 µg/ml.

2.5. MÉTODOS FISIOLÓGICOS

2.5.1. Cinéticas de crecimiento

El crecimiento bacteriano fue determinado por mediciones de la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO_{600nm}) en el espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia BiotechTM), para lo cual se utilizaron cubetas de plástico desechables de 1 ml.

2.5.2. Ensayos de la formación de biofilm

Para los ensayos de formación de biofilm se utilizó el método descrito por Genevaux y O'Toole y Kolter con ciertas modificaciones (Genevaux *et al.*, 1996; O'Toole *et al.*, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b). Se diluyó un cultivo saturado de la cepa a analizar a una DO_{600nm} de 0.1 en LB MOPS 100 mM pH 7.0 (o en otro medio); se inoculó 150 μ l en pozos de cloruro de polivinilo (PVC, 96-well vinyl assay plates. Costar, Cambridge MA) y se incubaron a 30°C o 37°C, en presencia o ausencia de oxígeno.

2.5.3. Detección y cuantificación del biofilm mediante tinción con cristal violeta

Después del tiempo de incubación; se lavaron tres veces los pozos con agua para remover las células que no se adhirieron; se detectó el biofilm formado mediante una tinción con cristal violeta al 1% por 20 min. Posteriormente se lavaron los pozos con H₂O para remover el cristal violeta no adherido a las células; se cuantificó la cantidad de biofilm formado eluyendo el cristal violeta de cada pozo con 200 μ l de solución etanol 80% y acetona 20% por una incubación de 20 min a 4°C. Pasado este tiempo se midió la DO_{590nm} de la elusión en el lector BECKMAN COULTER ® DTX880 Multimode Detector. La cantidad de biofilm formado se reportó en unidades arbitrarias (UA), una UA corresponde a la absorbancia medida para el control (pozo sin inocular).

2.5.4. Cinéticas de formación de biofilm

Para las cinéticas de formación de biofilm se siguió el mismo ensayo de formación de biofilm. Solo se detiene el ensayo en un tiempo ya establecido (cada 2 h) y se continua con los lavados, tinciones y cuantificaciones de los biofilms. Algunas veces se tomaron las mediciones de DO_{600nm} de las células en suspensión de cada pozo de la cinética.

2.5.5. Ensayos de motilidad

En los ensayos de motilidad se observó el desplazamiento de las células alrededor de un punto de inoculación. Se observó el “swimming” en placas con triptona 10 g/L, NaCl 5g/L y agar 0.3% donde se inoculó 2 μ l de cultivo saturado y se incubó a 30°C de 4 a 12 h. Se observó el “swarming” en placas con triptona 10 g/L, glucosa 5g/L y agar 0.5% donde se inoculó una colonia con un palillo hasta el fondo de la placa y se incubó a 30°C por una noche; y el “twitching” en placas con triptona 10 g/L, NaCl 5g/L, extracto de levadura 5 g/l y agar 1% donde se inoculó con un palillo hasta el fondo de la placa y se incubó la 37°C por 24h. Todos los ensayos se hicieron en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y en algunos experimentos las placas fueron suplementadas con glucosa 0.2%.

2.5.6. Análisis del efecto de los sobrenadantes (SN)

2.5.6.1. Obtención de sobrenadantes

Cuando se requirió mezclar células y sobrenadantes (SN) de cultivos en medio LB MOPS 100 mM, provenientes de una incubación aeróbica o anaeróbica para los ensayos de formación de biofilm, se realizó el siguiente procedimiento (las células y SN se utilizaron inmediatamente después de ser obtenidos); se inocularon en placas de microtitulación cultivos de *E. coli* (como se describió en 2.5.2.) se incubaron a 30°C, aeróbicamente por 24 h o anaeróbicamente por 48 h. Posteriormente se colectó el cultivo de varios pozos (aeróbicos y anaeróbicos por separados) en tubos para microcentrífuga eppendorf (epp) y se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min; se transfirió el SN a un tubo limpio y se colectaron las células en otro tubo. Después a

los SN se les eliminaron las células por filtración en membrana MFTM (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm.

Alternativamente se obtuvieron los SN y células por crecimiento de cultivos estáticas en tubos de vidrio de 8 ml, los cuales fueron sellados con PARAFILM "M" para generar las condiciones anaeróbicas y tubos de ensayo para generar las condiciones aeróbicas.

2.5.6.2. Mezcla de células y SN

Se mezclaron las células con los SN o medio nuevo (como se indica en cada experimento), se inocularon placas de microtitulación (150 µl por pozo) y se incubaron aeróbicamente por 24 h o anaeróbicamente por 48 h a 37°C o 30°C. Posteriormente se lavaron los pozos, se tiñeron y se cuantificaron como se describió en la sección 2.5.3.

2.5.7. Cinética de producción del factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico

A partir de cultivos saturados de las cepas Souza298 y W3110, se diluyó en LB MOPS 100 mM pH 7.0. a una DO_{600nm} de 0.1 a 0.199. Se inocularon en tubos de ensayo (tapón de rosca) de capacidad de 3-4 ml o 7-8 ml o de 12-13 ml y se selló con PARAFILM "M". Los tubos se incubaron a 30°C, sin agitación por los tiempos requeridos para obtener la cinética. Después se filtraron los SN de cada tiempo (filtro 0.45 µm) y se mezclaron con células de W3110 provenientes de un over night (ON) en LB de densidad 0.1-0.2. Se inocularon pozos de PVC con 150 µl de esta mezcla y se incubaron en anaerobiosis a 30°C por 24 h o 48 h (no hay diferencias por el tiempo de incubación). Después del tiempo de incubación indicado, se desechó el cultivo de los pozos y se detectó el biofilm mediante tinción con cristal violeta. Cabe señalar que esta metodología está descrita en el artículo anexo.

2.5.8. Naturaleza del factor de promoción de la formación de biofilm anaeróbico

Para saber la naturaleza del factor se hizo un estudio de la sensibilidad del factor en el SN de la cepa Souza298 con proteinasa K, DNasa I y calor. Así como de extracciones orgánicas con cloroformo, acetato de etilo, éter y fenol. La metodología detallada se describe en el artículo anexo a este trabajo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

2.5.9. Microscopia electrónica de transmisión

Se colectaron células de *E. coli* W3110 provenientes de una incubación a 30°C por 48 h en anaerobiosis y se incubaron a 30°C por 48 h en anaerobiosis con: LB; con el SN de *E. coli* Souza298 proveniente de una incubación a 30°C por 48 h anaeróbico y con el SN de *E. coli* W3110 proveniente de una incubación a 30°C por 48 h anaeróbico. Estas células fueron preparadas para su observación al microscopio electrónico de transmisión mediante una fijación primaria con glutaraldehído 3% en buffer de fosfatos por 2 h; esta preparación se lavó tres veces con buffer de fosfatos a 4°C más un lavado por una noche (este procedimiento duró 12 h); la preparación se fijó por segunda vez con tetraóxido de osmio 3% en buffer PBS por 2 h; la preparación se lavó por una noche en PBS. Después la preparación se deshidrató con lavados de 5 a 15 min de etanol 30%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 95% (dos cambios) y etanol 100% (dos cambios por 20 min), todas las soluciones a 4°C. Se lavó la preparación tres veces por 10 min con una solución de deshidratación (que es un solvente intermediario el cual es más miscible con la preparación) como el óxido de propileno que reemplaza al etanol. Después se reemplaza los fluidos de la muestra con monómeros de resinas epoxicas mediante una infiltración con una mezcla de Epon que son resinas, endurecedores y aceleradores que se incrustan en la preparación, hasta su polimerización a 60°C por dos días. Después se obtienen cortes de la preparación de 70-80 nm de grosor, los cuales se contrastan con acetato de uranilo 2% y citrato de plomo 2%. Se observó la muestra al microscopio electrónico JEOL 1200 EX II con cámara digital Gatan 673 con resolución de 4 angstroms, con magnificación de 50x a 600 000x del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

2.5.10. Ensayos de aglutinación

Para ver el efecto del SN de *E. coli* Souza298 en la expresión de fimbria se mezcló con células de *E. coli*, y con células de *Sacharomyces cerevisiae* W303. El protocolo utilizado esta descrito en el artículo anexo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

2.6. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

2.6.1. Expresión de fimbrias y producción de celulosa

Se crecieron las cepas de estudio en placas de triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y agar 2%, adicionado con rojo congo 40 µg/ml y azul de Coomassie 20 µg/ml. Para el crecimiento se estriaron colonias frescas y se incubaron a 37°C y 30°C tanto aeróbicamente como anaeróbicamente por 72 h.

2.6.2. Geles de poliacrilamida

Para la visualización de las proteínas extracelulares de los SN se prepararon geles de acrilamida. Se utilizaron los vidrios de BIO-RAD Mini PROTEAN 3 System Glass Plates Short Plates y los peines de 10 carriles con espaciadores de 1.0 mm. Para la preparación del gel separador al 9% y del gel concentrador 5 % se mezclaron las soluciones de la Tabla 2.3 en frascos por separado.

Tabla 2.3. **Soluciones para los geles de acrilamida.**

Solución	Gel separador al 9%	Gel concentrador 5 %
Solución de acrilamida 29.2%, bisacrilamida (BIS) 0.8% filtrado por millipore 0.45 µm	3.6 ml	0.83 ml (830 µl)
Buffer 1 (TRIS 1.5 M pH 8.8)	3 ml	-
Buffer 2 (TRIS 0.5 M pH 6.8)	-	1.25 ml
SDS 10%	0.12 ml (120 µl)	0.05 ml (50 µl)
Agua milli-Q estéril	5.22 ml	2.82 ml
Ya montado el gel se le agrega	*Nota	*Nota
Persulfato (amonio persulfato) BIO-RAD 0.03 g en 300 µl de agua	0.06 ml (60 µl)	0.05 (50 µl)
TEMED de BIO-RAD	0.006 µl (6 µl)	0.005 (5 µl)

*Nota: Se montó primero el gel separador; se le agregó isopropanol para eliminar burbujas de aire y se dejó gelificar 45 min, después con agua se quitó el isopropanol y se secó con papel Watman. Se preparó el gel concentrador y se agregó colocando el peine del grosor del gel; se dejó gelificar 20 min; se quitó el peine y se lavaron los pozos para eliminar restos de gel. Las muestras fueron 15 µl de SN mas 10 µl del buffer de carga con Laemmli (glicerol 10 %, SDS 2.3 %, Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, β mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.001 %). El marcador de peso molecular que se utilizó fue Kaleidoscope Prestained Standards (Catalog 161-0324, Control 300001370). Después se hizo una electroforesis de los geles sumergidos en buffer Laemmli 1X (Trizma Base 3.02 g, glicina 16.55 g y SDS 10% 10 ml) a 100 Volts por 2 h. Para la detección de proteínas en los geles se hizo una tinción con azul de coomassie R-250 1% por 15 min y se destiño con ácido acético 7% y metanol 5% durante una noche

Alternativamente la tinción de los geles fue por medio de la tinción por plata el cual consistió en:

Tabla 2.4. Metodología para la tinción por plata.

Paso	Solución	Tiempo
1. Fijar	50% MetOH, 10% AcOH	Por lo menos 1 hora
2. Lavar	50% EtOH	3 veces 20 minutos
3. Pretatar	Na ₂ S ₂ O ₃ 5H ₂ O (0.2 g/L)	1 minuto
4. Enjuagar	H ₂ O tridestilada	3 veces 20 segundos
5. Impregnar	- AgNO ₃ (2 g/L) - 0.75 mL HCOH al 37% / L	20 minutos
6. Enjuagar	H ₂ O tridestilada	2 veces 20 segundos
7. Revelar	- Na ₂ CO ₃ (60 g/L) - 0.5mL de HCOH al 37%/L - Na ₂ S ₂ O ₃ , 20 mL/L de la solución en 3	10 minutos
8. Lavar	H ₂ O tridestilada	2 veces dos minutos
9. Parar la reacción	AcOH 1%	Los geles se quedan en esta solución

MetOH= metanol; AcOH= ácido acético; EtOH= etanol; Na₂S₂O₃ 5H₂O= tiosulfato de sodio; AgNO₃= nitrato de plata; HCOH= formaldehido; Na₂CO₃=carbonato de sodio

Después de desteñir el gel, se colocó sobre papel Whatman™ 3MM en un secador de geles por 1 h.

2.7. MÉTODOS GENÉTICOS

2.7.1. Banco de mutantes

El banco de mutantes fue donado por el Dr. William S. Reznikoff del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin-Madison, Estados Unidos. Esta librería fue hecha mediante una mutagénesis mediada por la inserción del transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> (No. Catalogo TK0701 EPICENTRE[®]) en el DNA cromosomal de *E. coli* K-12 MG1655. Alternativamente se generó otro banco de mutantes usando los transposones mini-Tn5 (λ NK1105) y mini-Tn10 (λ NK1098 y λ NK1323) que confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente. El método que se empleó fue descrito por Kleckner y colaboradores (Kleckner *et al.*, 1991) que consistió en:

2.7.1.1. Preparación del lisado con fago λ

Se creció un cultivo a saturación de la cepa C600 (ésta contiene una mutación en el supresor *supE* que permite insertar glutamina en los codones de término tipo ámbar) a 37°C en LB; se colectaron las células por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min y se resuspendieron en 750 μ l de MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM. Posteriormente se mezclaron 50 μ l de células con 50 μ l de fagos λ ; se incubó 10 min a TA y se agregó 2 ml de LB MgSO₄ 10 mM; se incubó de 2 h a 37°C. Una vez que el cultivo se liso se agregaron dos gotas de cloroformo. Después se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregaron dos gotas de cloroformo. Los lisados se almacenaron a 4°C.

2.7.1.2. Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10

Se creció un cultivo de la cepa MG1655 o W3110 a 37°C, en LB; se colectaron las células por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min; se resuspendieron en 750 μ l de MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM; se mezclaron 100 μ l de células con 100 μ l de lisados de fagos y se incubaron 10 min a TA. Después se agregaron 2 ml de LB MgSO₄ 10 mM y se incubaron a 37°C sin agitación por 1 h. Finalmente se platearon diluciones seriales en medio selectivo.

La selección de mutantes se llevó a cabo aeróbicamente y anaeróbicamente y la detección del fenotipo de las mutantes se realizó mediante ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación (como se describió en 2.5.2).

2.7.2. Transformación con plásmidos

El protocolo que se empleó está basado en el método de transformación por CaCl_2 , descrito en Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001), el cual consistió en obtener un cultivo de 12 h u “overnight” (ON) en 3 ml de medio LB de la cepa a transformar a 37°C; se tomó 800 μl del ON y se inoculó en 20 ml de LB; se incubó a 37°C hasta que alcanzará una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.5; se centrifugó a 4°C por 10 min a 3000 rpm; se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de CaCl_2 100 mM frío y se agitó hasta que se disolviera el pellet; se centrifugó a 4°C por 10 min a 3000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 5 ml de CaCl_2 100 mM frío hasta que se disolviera el pellet y se incubó en hielo 40 min; se centrifugó a 4°C por 10 min a 3000 rpm y se resuspendió en 2 ml de CaCl_2 100 mM frío. Posteriormente se mezcló en epp: 25 μl de células más 2 μl de plásmido conocido (control positivo); 25 μl de células más 2 μl de plásmido de estudio y 25 μl células más medio LB (control negativo); se incubaron 45 min en hielo; pasado este tiempo se incubó a 43°C por 90 segundos; se agregó 1 ml de LB y se incubó a 37°C por 2 h; se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min; se resuspendió en 500 μl de Medio de Dilución (MD) (MgSO_4 10 mM) y se plateó en LB sólido con el antibiótico de selección.

También se utilizó otro protocolo el cual consistió en obtener un cultivo de la cepa a transformar en LB a 37°C, se tomó 250 μl del ON y se inoculó en 50 ml de LB; se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzara una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.7-0.9. Después se vació el cultivo en tubos falcon y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C por 10 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25 ml de glicerol al 10% frío. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de glicerol 10% frío; se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 μl de glicerol 10% frío. Se mezclaron en epp. 45 μl de células más 2 μl de plásmido conocido, 43 μl de células más 2 μl de plásmido de estudio (control positivo) y 43 μl de células más 2 μl de medio LB (control negativo). En celdas de electroporación de BIO-RAD Gene

Pulser Cuvette (*E. coli* Pulser Cuvette No. Catálogo 165-2089 de 0.1 cm de capacidad) en frío a -20°C se colocaron las mezclas de células mas los plásmidos. Y se electroporaron en BIO-RAD Micropulse (con el programa Ec1 para bacterias) por un pulso; se esperó 2 seg y se colocaron las celdas en hielo, a cada celda se le agregó 1 ml de LB y se pasó a un epp. Posteriormente se incubó en agitación por 3 h a 37°C . Después se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μl de MD y se plateó en cajas de LB.

2.7.3. Transducción de mutaciones mediada por bacteriófagos P_1

La transducción es un proceso por el cual se transfiere material genético de una cepa a otra utilizando como vehículo de entrega a bacteriófagos. En este trabajo se utilizó el bacteriófago P_{1vir} que es una variedad del fago P_1 que no puede formar lisógenos.

2.7.3.1. Preparación de lisados del bacteriófago P_1

Se creció un cultivo saturado de la cepa donadora JMH1814 y JMH1819 a 37°C , en LB CaCl_2 5 mM más kanamicina, se centrifugó el cultivo a 14 000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante; se resuspendió el pellet en 750 μl de MgSO_4 10 mM; se mezclaron 200 μl de células con 200 μl de bacteriófago P_{1vir} y se incubaron a 37°C sin agitación por 20 min. Después se agregaron 2 ml de LB CaCl_2 5 mM; se agitó y se incubó a 37°C , 200 rpm por 4 h; se removieron los restos celulares por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, esto se repitió dos veces. Al final se adicionó al sobrenadante que contiene los lisados de las cepas, 2 gotas de cloroformo; se agitó y se almaceno a 4°C .

2.7.3.2. Transducción al genoma con el bacteriófago P_1

Se creció un cultivo de la cepa receptora MG1655 y W3110 a 37°C , en LB CaCl_2 5 mM; se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 750 μl de MgSO_4 10 mM. Los lisados se diluyeron 10^0 a 10^{-4} en MgSO_4 10 mM y se mezclaron con 100 μl de células. Como control para checar que las células receptoras no fueran resistentes al antibiótico y que los lisados no

contuvieran células se colocaron dos tubos epp. con sólo células y fagos. Después se incubaron a 37°C por 20 min. Se centrifugaron las células mas los fagos a 14 000 rpm por 5 min y se decanto el sobrenadante; se resuspendieron en LB y se centrifugaron a 14 000 rpm, esto se repitió al menos 4 veces. Al final de estos lavados se agregó 1 ml de LB y se incubó a 37°C, 200 rpm por 2 h. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min; se decantó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 80 µl de MgSO₄ 10 mM y se plateó en medio selectivo.

2.8. MÉTODOS MOLECULARES

2.8.1. Obtención de DNA genómico

La purificación del DNA genómico se llevó a cabo siguiendo el método de extracción por fenol-cloroformo, que consistió en obtener un cultivo de la cepa requerida en 50 ml de LB a 37°C. Se colectaron las células y se resuspendieron en 10 ml de solución amortiguadora TE (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM); se le agregaron 10 mg de lisozima y se incubaron 15 min a 30°C. Después se adicionó 1 ml de SDS al 20% y se mezcló por 15 seg usando una pipeta; se adicionó 10 ml de fenol (en solución amortiguadora TE y 1.5 ml de NaCl 5 M); se mezcló por inversión el tubo por 20 min a TA. Se separaron las fases por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min; se removió la fase superior con una pipeta y se transfirió a un tubo limpio. Se adicionó un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se mezcló por 10 min, esto se repitió dos veces. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo y se mezcló durante 10 min, esto se repitió dos veces. Se adicionó un volumen de isopropanol para que se formaran dos fases; se mezcló suavemente la interfase utilizando una varilla de vidrio para recoger el DNA en forma de fibras y se lavó con etanol 70% frío; se secó a TA y se disolvió en 1 ml de TE.

Después se le adicionó RNAsa I a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a 50°C por 1 h; se le adicionó Proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 37°C por 1 h. Finalmente para obtener el DNA puro se adicionó 5 ml de TE y un volumen de fenol:cloroformo (1:1); se mezcló por 10 min; se centrifugó y se recuperó la fase superior. A esta fase se le adicionó un volumen de cloroformo y se mezcló por 10 min; se centrifugó y se recupero la fase superior, esto se repitió dos veces. Después se adicionó un volumen de isopropanol para que se

formaran dos fases; se mezcló suavemente la interfase utilizando una varilla de vidrio para recoger el DNA en forma de fibras y se lavó con etanol 70% frío; se secó a TA y se disolvió en 1 ml de TE.

Alternativamente se aisló DNA utilizando el kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega). Las condiciones empleadas fueron: a partir de un cultivo saturado de la cepa de interés se centrifugó 1 ml por 2 min a 14 000 rpm; se desechó el SN y el pellet se disolvió en 600 µl de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 8.0) el cual se incubó a 80°C por 5 min. Después se dejó enfriar a TA; se añadió 3 µl de solución de RNasa I (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente se dejó enfriar a TA; se mezcló con 200 µl de solución de precipitación para proteínas (acetato de potasio 3 M); se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó 10 min a 14 000 rpm. El SN se transfirió a un epp. con 600 µl de isopropanol se mezcló y se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm; se decantó el SN y se obtuvo un pellet blanco en el fondo del tubo que se lavó con 600 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm. Por último se eliminó el etanol por secado al aire y se obtuvo el pellet blanco el cual se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril y se incubó por una noche a 4°C.

2.8.2. Obtención de DNA plasmídico

La extracción de DNA plásmidos se realizó usando el kit de purificación de DNA de QIAGEN[™]. Se utilizó el protocolo “QIAprep Spin Miniprep Kit”, que permite la purificación de más de 20 µg de DNA plasmídico.

A partir de un cultivo saturado, se centrifugó 3 ml por 2 min a 14 000 rpm; se desechó el SN y al pellet se mezcló con 250 µl de solución P1 (RNasa A 100 µg/ml, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM); se le agregó 250 µl de solución amortiguadora P2 (NaOH 200 mM y SDS 1%); se mezcló invirtiendo el tubo hasta obtener una solución viscosa y clara; se le agregó 350 µl de solución amortiguadora N3 (CH₃COOK 3.0 M pH 5.5); se mezcló invirtiendo el tubo; se centrifugó por 10 min a 14 000 rpm y el SN se transfirió a una columna QIAprep; se centrifugó 30 seg y se decantó el SN. Posteriormente se lavó la columna agregando 750 µl de solución amortiguadora PE (80% etanol); se centrifugó 30 seg y se decantó el SN, adicionalmente se volvió a centrifugar y se decantó el resto del SN; se colocó la columna QIAprep en un epp. y se le añadió 50 µl de agua destilada estéril al centro

de la columna; se incubó por 1 min y se centrifugó por 1 min. El plásmido en solución se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.8.3. Digestiones de DNA

Las digestiones de DNA fueron hechas mediante las enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI*, *HpaI*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI*, *SmaI* y *XbaI* con sus respectivos amortiguadores de GIBCO BRL, Invitrogen™ y Promega. Se empleo 1 U de cada enzima por 1 μg de DNA y el amortiguador al 10% (v/v) total de la reacción. Esta mezcla fue incubada a 37°C por el tiempo indicado para cada enzima.

2.8.4. Geles de agarosa

Para visualizar moléculas de DNA se hicieron geles de agarosa (Sigma) al 1% en buffer TBE 1X (Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM pH 8.3) y se corrió una muestra de DNA mezclada con un buffer de carga (EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y glicerol 30% en agua destilada), en una electroforesis horizontal mediante el sistema de Bio-Rad subcell GT™ en buffer TBE 1X a 90 V por 1 h a temperatura ambiente. El peso molecular de los fragmentos analizados se determinó por comparación con un marcador 1 kb de Invitrogen™ que contiene 12 fragmentos de 1018 a 12 216 pb. Los geles fueron teñidos en solución de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV Hoefer) con la cámara digital DC290 ZOOM de KODAK™.

2.8.5. Hibridación tipo Southern

Para la localización del sitio de inserción del transposon EZ-Tn5™ <T7/KAN-2>, los geles con las digestiones de DNA fueron transferidos a membranas de nylon. Los geles fueron tratados de la siguiente manera: se cubrió el gel con solución depurinizadora (HCl 0.25 M) y se incubó en agitación por 12 min; se tiró la solución y se lavó el gel con agua destilada. Después se cubrió el gel con solución desnaturizadora (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M) y se incubó en agitación por 25 min, se tiró la solución y se lavó el gel con agua destilada. Por ultimo se cubrió el gel con solución neutralizadora (NaCl 1.5 M y Tris HCl 0.5 M, ajustado a pH 7.5) y se incubó

en agitación por 30 min, se tiró la solución y se lavó con agua destilada. Después se montó la transferencia como se muestra en la Figura 2.1.

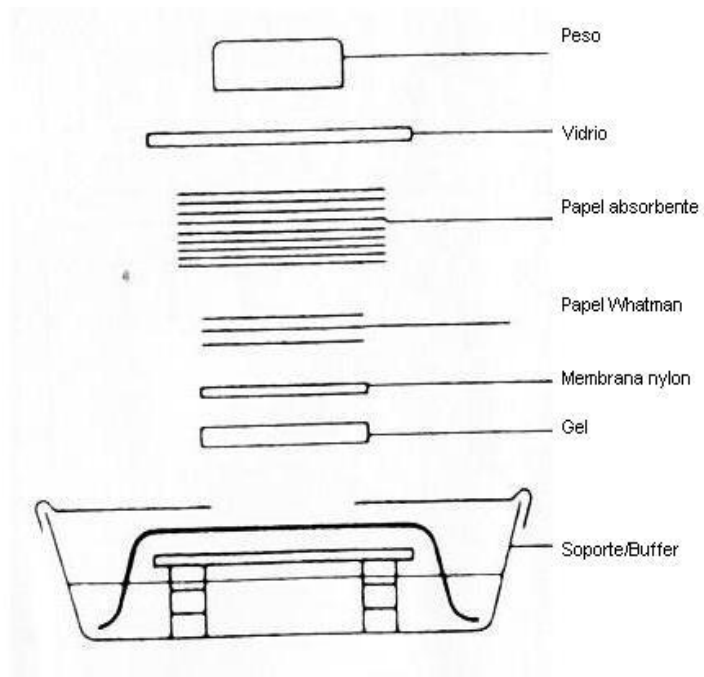


Figura 2.1. Componentes de la transferencia de DNA a una membrana.

2.8.5.1. Transferencia del DNA por capilaridad

En un recipiente se agregó buffer SSC 20X (citrato de Na 0.3 M y NaCl 3 M ajustado a pH 7.0); se colocó un soporte y un puente de papel Whatman™ 3MM donde se montó el gel previamente tratado; se colocó encima del gel una membrana de nylon (Hybond™-N+, Amersham Pharmacia Biotech), papel Whatman™ 3MM y toallas absorbentes tamaño del gel y un peso de 1 kg. La transferencia por capilaridad del DNA del gel a la membrana se completó a las 12 h.

2.8.5.2. Fijación del DNA a la membrana

Después de la transferencia del DNA a la membrana se desmontó la transferencia y se marcaron los carriles donde corrió cada muestra con un bolígrafo. Se fijó el DNA por medio de crosslinking bajo luz UV a 120 mJ (UV1800 Stratalinker, Stratagene).

2.8.5.3. Marcado de la sonda

El DNA que fue utilizado como sonda, se obtuvo mediante digestión del plásmido pUC4K que contiene un cassette de kanamicina entre los sitios de restricción de la enzima *Bam*HI. Los fragmentos de DNA fueron purificados mediante “QIAquick™ PCR Purification Kit”. El marcaje de la sonda se hizo mediante el sistema de detección y marcaje directo de ácidos nucleicos de Amersham Pharmacia Biotech™: ECL. En el cual 100 ng de DNA (10 µl) se desnaturalizaron a 100 °C durante 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo por 5 min; se centrifugó para concentrar el contenido en la base del tubo y se agregó 10 µl del agente marcador y 10 µl de glutaraldehído los cuales se mezclaron ligeramente y se incubaron durante 10 min a 37°C.

2.8.5.4. Hibridación

Para la preparación del Buffer de Hibridación (Gold Hybridization Buffer ECL), se requirió 0.25 ml del buffer por cada cm² del recipiente usado. A 30 ml del buffer se le agregó NaCl 0.5M y 5% de agente bloqueador, esta solución (buffer de hibridación preparado) se agregó a la membrana con el DNA y se incubó en un horno de hibridación a 42°C por 20 min. Posteriormente se le agregó la sonda previamente marcada y se mantuvo en agitación e incubación a 42°C durante una noche.

2.8.5.5. Lavado de la membrana

La membrana fue lavada dos veces con buffer primario (SDS 0.4% y SSC 0.5X) precalentado a 55 °C por 10 min. Posteriormente la membrana se lavo dos veces con buffer secundario (SSC2X) por 5 min a temperatura ambiente.

2.8.5.6. Generación y detección de señal luminosa

A la membrana previamente lavada se le quitó el exceso de buffer y se le agregó volúmenes iguales del reactivo de detección 1 (contiene peróxido) y del reactivo de detección 2 (luminol) por 1 min a TA. Después se eliminó el exceso de la mezcla de

los reactivos de detección; se colocó la membrana entre dos acetatos en un cassette con películas de diagnóstico Hyperfilm-ECL® durante 5 min o una noche.

2.8.5.7. Revelado de película autoradiográfica

Las soluciones de revelado y fijadora KODAK™. Se colocó la película en un recipiente con solución reveladora, se incubó hasta que aparecieron bandas oscuras, se lavó con agua y se colocaron en solución fijadora y se lavó la película con agua.

2.8.6. Clonación por ligación de fragmentos de DNA

Se realizó un análisis de restricción con diferentes enzimas que no pudiesen digerir el transposon EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> con el fin de obtener un fragmento que pudiera clonarse en los plásmidos pUC18 y pSK+ para su posterior secuenciación. Para lo cual se extrajo el DNA cromosomal de la mutante JMH1814 y se digirió con la enzima *Pst*I. Se utilizó la DNA ligasa del bacteriófago T4, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3'-OH y 5'-fosfato del fragmento de DNA que contiene al transposon EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> de la mutante JMH1814, con los plásmidos lineales de pUC18 y pSK+ digeridos con *Pst*I. Después de la ligación se realizó una transformación en la cepa XL1-Blue, para seleccionar las clonas contengan a los plásmidos con la ligación del DNA de la mutante mediante una selección por la resistencia a kanamicina (transposon EZ-Tn5™ <T7/KAN-2>) y ampicilina (en plásmidos pUC18 y pSK+).

2.8.7. Purificación de fragmentos de DNA en solución

Para limpiar los fragmentos de DNA o plásmidos digeridos, de enzimas y otros reactivos que pudiesen afectar pasos subsecuentes en su manipulación, se utilizó el kit "QIAquick™ PCR Purification Kit". Mediante este método se puede purificar fragmentos de 100 pb a 10 kb. Al volumen inicial de la muestra de PCR o producto de digestión que se purificó se le mezcló 5 volúmenes de solución amortiguadora PB y se transfirió a una columna QIAquick™ y se centrifugó 30 seg. La columna QIAquick™ se lavó con 750 µl de solución amortiguadora PE y se centrifugó 30 seg

y se volvió a centrifugar 1 min a 14 000 rpm. Posteriormente la columna se paso a un epp. y se le agregó 50 µl de agua destilada al centro de la membrana de la columna y se centrifugó por 1 min.

2.8.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa

También este proceso se llevó a cabo usando el kit "QIAquick™ Gel Extraction Kit" de QIAGEN. Este protocolo esta diseñado para extraer y purificar DNA de 70 pb a 10 kb. El fragmento de DNA del gel de agarosa se cortó con una espátula, se peso en tubos Eppendorf (epp) de 1.5 ml. y se disolvió en 3 volúmenes de solución amortiguadora QG a 1 volumen del gel (100 mg ~ 100 µl), a 50°C por 10 min o hasta que el gel se haya disuelto por completo. Una vez que el gel se disolvió por completo, se mezcló con un volumen isopropanol y se transfirió la mezcla en una columna QIAquick;™ se centrifugó por 1 min, se decanto el SN y se lavó la columna con 500 µl de solución amortiguadora QG y se centrifugó por 1 min. También se lavó la columna con 750 µl de solución amortiguadora PE y se centrifugó 2 veces por 1 min decantando el SN, entonces la columna se coloco en un epp. y se le agrego 50 µl de agua destilada al centro de la membrana y se centrifugó por 1 min.

2.8.9. PCR

Para la amplificación del gen completo 16S (subunidad del gen ribosomal), se utilizaron los oligonucleótidos 515FPL (5'-GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GC CAG CAG CCG CGG TAA-3'), y 1492RPL (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3') (Angert, *et al.*, 1998) y, 1492R y 27F descritos en el artículo anexo, así como las condiciones de amplificación. El producto de PCR fue de alrededor de 1500 pb y para obtener las amplificaciones internas del gen para su posterior secuenciación se utilizaron los primer denominados 981R, 357R, 530R y 27Fsec descritos por Sacchi (Sacchi *et al.*, 2002) así como las condiciones de amplificación.

2.8.10. Secuencia de DNA

Para la secuenciación del gen 16S se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Ecología de la UNAM. Empleando el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems, basado en un sistema automatizado de electroforesis capilar, con una capacidad de lectura de 400-600 pb.

Para la secuenciación del plásmido pSK+(1) que contiene el fragmento que contiene al transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> de la mutante No. 12 de 3 kb generado por el corte de la enzima *Pst*I se utilizaron los oligonucleótidos M13-21 5' TGTAACGACGGCCAGT 3' y M13 Rev 5' TTCACACAGGAAACAG 3', el proceso de secuenciación fue llevado a cabo en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

2.8.11. Geles tipo Eckardht (perfil genómico)

Para la visualización del perfil de replicones se empleó el método de Hynes y McGregor (1990) con las modificaciones siguientes: los geles de agarosa fueron al 0.75% con SDS al 0.9%; las cepas fueron incubadas a 37°C en medio LB; se utilizó 100 µl de cultivos de 12 h con DO_{600nm} de 0.4 a 0.5; se utilizó 250 µl de solución de sarcosyl al 0.3%; se resuspendió la reacción en 25 µl de solución de lisis que contenía 9 mg/ml de lisozima. Se corrió una electroforesis horizontal en buffer TBE 1X, a 80 V por 3 h a TA. Los geles fueron teñidos en solución de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta (UV). El peso molecular de los replicones fue estimado a partir del marcador de peso molecular de 1 kb plus.

2.9. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

2.9.1. Alineamiento de secuencias

Para el alineamiento de los fragmentos internos del gen 16S de *E. coli* Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Versión 5.0.9). Se utilizaron las 35 secuencias del gen 16S.

2.9.2. Análisis tipo BLAST

Las secuencias del gen 16S de *E. coli* Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 fueron comparadas con las secuencias reportadas en las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio del programa BLASTn (nucleótido-nucleótido) y directamente con el genoma de *E. coli* reportado en el GenBank (página web www.ncbi.nlm.nih.gov).

3. RESULTADOS

“ANÁLISIS DE UN BANCO DE MUTANTES”

3.1 Razonamiento de los experimentos

En secciones anteriores de este trabajo se reportó que en estudios sobre las cinéticas de formación de biofilm de *E. coli* K-12 (Colón-González *et al.*, 2004), por el método de O`Toole *et al.*, (1999) y modificado por Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, (2002b), se encontró que existe un máximo de producción de biofilm a las 24 horas de cultivo aeróbico y que a partir de este tiempo inicia la disgregación del biofilm (Colón-González *et al.*, 2004).

Por otra parte se han identificado algunos determinantes genéticos que promueven la formación y/o disgregación del biofilm mediante análisis de bancos de mutantes (Huber *et al.*, 2001; Valle *et al.*, 2003).

De acuerdo con lo anterior, el encontrar mutantes de *E. coli* capaces de mantener un biofilm por 52 horas nos permitiría saber que genes están involucrados en evitar y/o mantener que un biofilm se disgregue.

3.2 Estrategia a seguir

Para lo cual la cepa de *E. coli* K-12 MG1655 fue mutagenizada con el transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> y con los transposones mini-Tn5 (λ ANK1105) y mini-Tn10 (λ ANK1098 y λ ANK1323 respectivamente), posteriormente se seleccionaron las células capaces de formar un biofilm mayor que la cepa parental a las 52 h de incubación aeróbica a 37°C.

3.3 Aislamiento de mutantes

El aislamiento se hizo a partir de colonias de mutantes que se inocularon en 150 μ l de LB MOPS 100 mM adicionado con kanamicina 25 μ g/ml y que se incubaron por 52 h bajo condiciones aeróbicas a 37°C. De una selección de 5000 mutantes se lograron aislar dos mutantes capaces de mantener un biofilm por 52 horas de

incubación aeróbica. Las cuales fueron denominadas mutante No. 12 (JMH1814) y mutante No. 17 (JMH1819).

3.4. Análisis de las mutantes

3.4.1. Formación de biofilm de las mutantes

Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describió en 2.5.2 de la sección de material y métodos, se utilizaron cultivos de las cepas de *E. coli* MG1655 (cepa parental) y de las mutantes No. 12 y No. 17. Los cultivos se hicieron en LB MOPS 100 mM pH 7.0 y se inocularon en placas de microtitulación que se incubaron a 37°C bajo condiciones aeróbicas. La detección del biofilm se llevó a cabo como se describió en 2.5.3 de la sección de material y métodos. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.1.

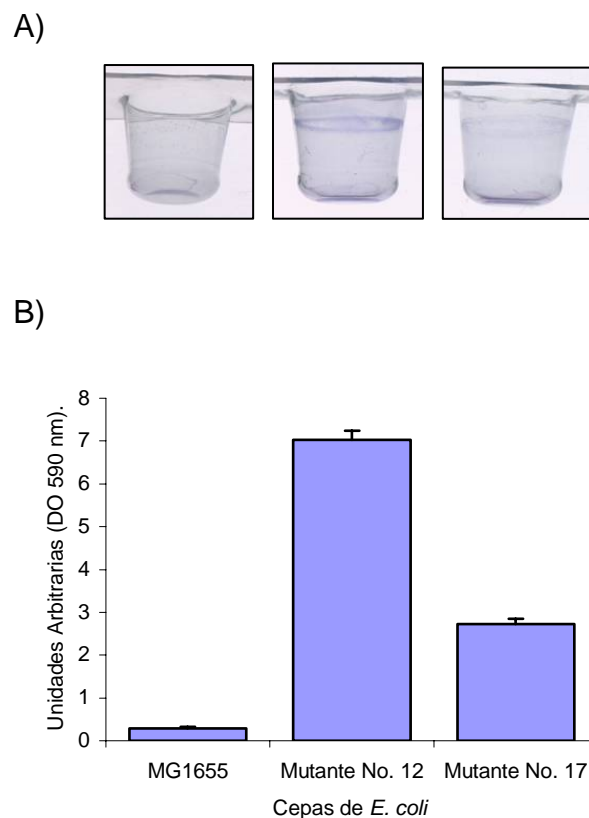


Figura 3.1. **Formación de biofilm de las cepas mutantes No. 12 y No. 17 y de la cepa silvestre.** A) Formación de biofilm en pozos de microtitulación por 52 h de incubación aeróbica de la cepas de izquierda a derecha, MG1655, mutante No. 12 y mutante No. 17. B) Cuantificación del biofilm formado por 52 h de incubación aeróbica de A), cada experimento se repitió tres veces.

Como se observa en el panel A, en condiciones aeróbicas el biofilm se forma como un anillo alrededor de la interfase aire-medio; estos resultados concuerdan con datos previos (O'Toole *et al.*, 1999; Spiers y Rainey, 2005; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001). También se observa que las mutantes No. 12 y No. 17 mantienen un biofilm de mayor biomasa que la cepa parental MG1655 (panel B, Figura 3.1).

3.4.2. Cinética de crecimiento de las mutantes

Como parte de la caracterización fisiológica de las mutantes y para descartar que debido a un crecimiento mayor de las mutantes No. 12 y No. 17, estas mantuvieran el fenotipo de mayor formación de biofilm a las 52 h de incubación aeróbica que su cepa parental, se determinó la curva de crecimiento.

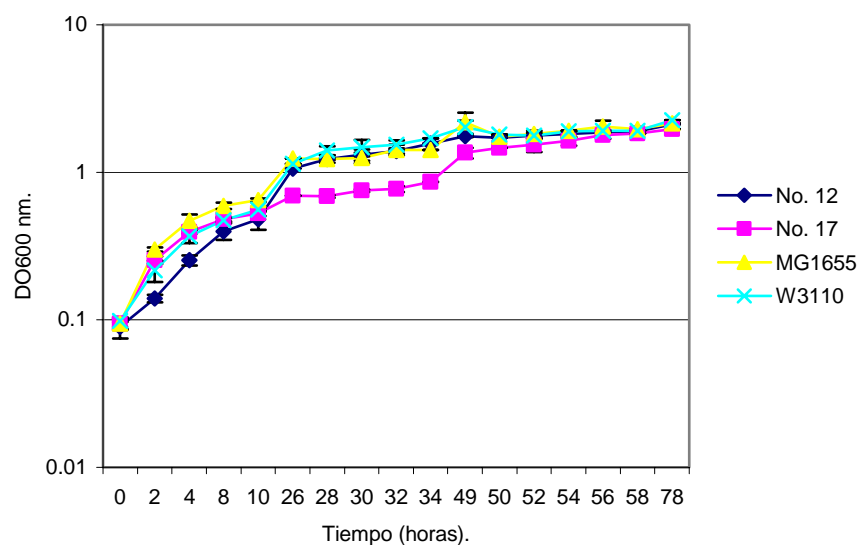


Figura 3.2. **Cinética de crecimiento de las mutantes No. 12 y No. 17.** Las mediciones fueron tomadas de pozos de microtitulación a partir de un cultivo de las mutantes No. 12 y No. 17, de MG1655 y de W3110 en LB MOPS incubado a 30°C bajo condiciones aeróbicas. Cada experimento fue repetido tres veces.

Las cinéticas de crecimiento se hicieron tomando la DO_{600nm} de cultivos inoculados en pozos de microtitulación. Los cultivos fueron en LB MOPS a 30°C o 37°C (no hay diferencias en la cinética de crecimiento) de las cepas MG1655 (parental), de las mutantes No. 12, de la mutante No. 17 y de W3110 (cepa de

estudio que se describirá en otro apartado de esta tesis). Las cinéticas de crecimiento se observan en la Figura 3.2.

Como se muestra en la Figura 3.2, el crecimiento de los cultivos en condiciones aeróbicas llegó a fase estacionaria. Por otro lado, aunque la mutante No. 17 muestra una disminución en la DO_{600nm} durante las primeras horas de la cinética, el crecimiento alcanzó la misma DO_{600nm} que las otras cepas en fase estacionaria. Además a las 52 h, las cepas de estudio tienen una DO_{600nm} similar, por lo que el crecimiento no afecta el fenotipo de mayor formación de biofilm o mantenimiento del biofilm. Cabe señalar que las curvas de crecimiento tanto en condiciones estáticas y en agitación en matraces son muy similares a las mostradas en la Figura 3.2.

3.4.3. Cinéticas de formación de biofilm de las mutantes

Previos estudios en nuestro laboratorio sobre las cinéticas de formación de biofilm (Colón-González *et al.*, 2004), mostraron que el biofilm es un proceso acumulativo, ya que la cantidad de biofilm formado aumenta conforme el tiempo de incubación y alcanza un punto máximo a las 24 h. Sin embargo, después de 24 h de incubación, la cantidad de biofilm formado disminuye, lo cual sugiere la disgregación del mismo, resultados similares han sido observados en *P. fluorescens* (Allison *et al.*, 1998) y en *P. aeruginosa* (Hinsa *et al.*, 2003). Estos estudios fueron realizados en la cepa W3110 de *E. coli* pero no en las cepas utilizadas en este trabajo. Por lo cual se estudió el comportamiento de las cinéticas de formación de biofilm en las mutantes No. 12 y No. 17 y en su cepa parental MG1655.

Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describió en 2.5.2 de la sección de material y métodos; se utilizaron cultivos de las cepas de *E. coli* MG1655 (cepa parental) y de las mutantes No. 12 y No. 17. Los cultivos se hicieron en LB MOPS 100 mM pH 7.0, se inocularon en placas de microtitulación y se incubaron a 37°C bajo condiciones aeróbicas. La detección del biofilm se llevó a cabo como se describió en 2.5.3 de la sección de material y métodos. Los datos se muestran en la Figura 3.3.

A)



B)

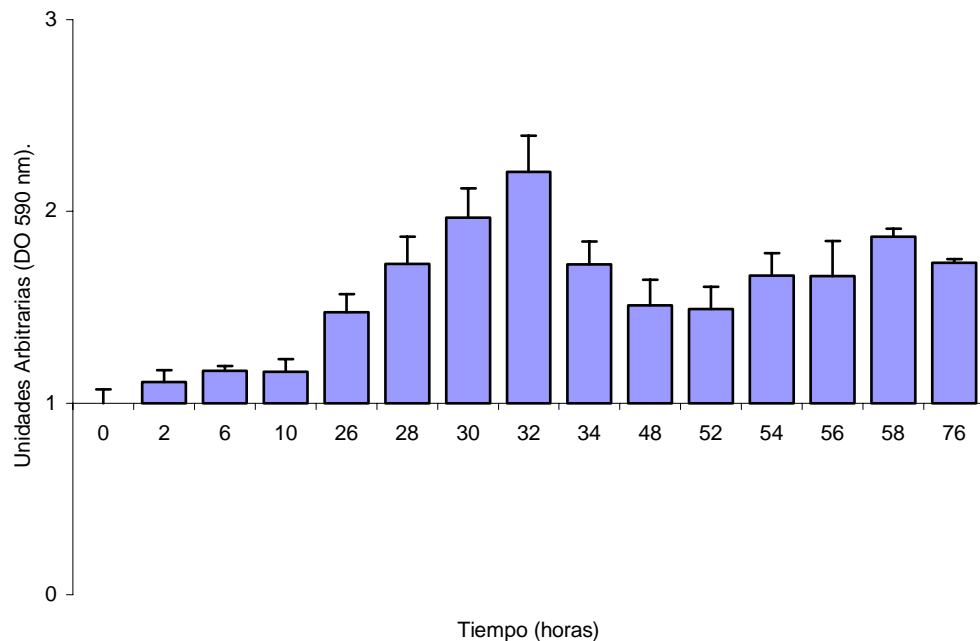


Figura 3.3. **Cinética de formación de biofilm de *E. coli* MG1655 a diferentes tiempos de incubación aeróbica.** A) Formación de biofilm a lo largo de la curva de crecimiento bajo condiciones aeróbicas (+O₂). B) Cuantificación del biofilm formado en condiciones aeróbicas. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm en el pozo correspondiente al tiempo 0. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

Como se observa en la Figura 3.3, la cinética de formación de biofilm de la cepa parental MG1655 presenta un máximo de producción de biofilm a las 32 h de incubación aeróbica, a partir de este punto hay una disgregación del biofilm que vuelve a aumentar a partir de las 52 h y alcanza un segundo punto de máxima producción de biofilm a las 58 h.

A)



B)

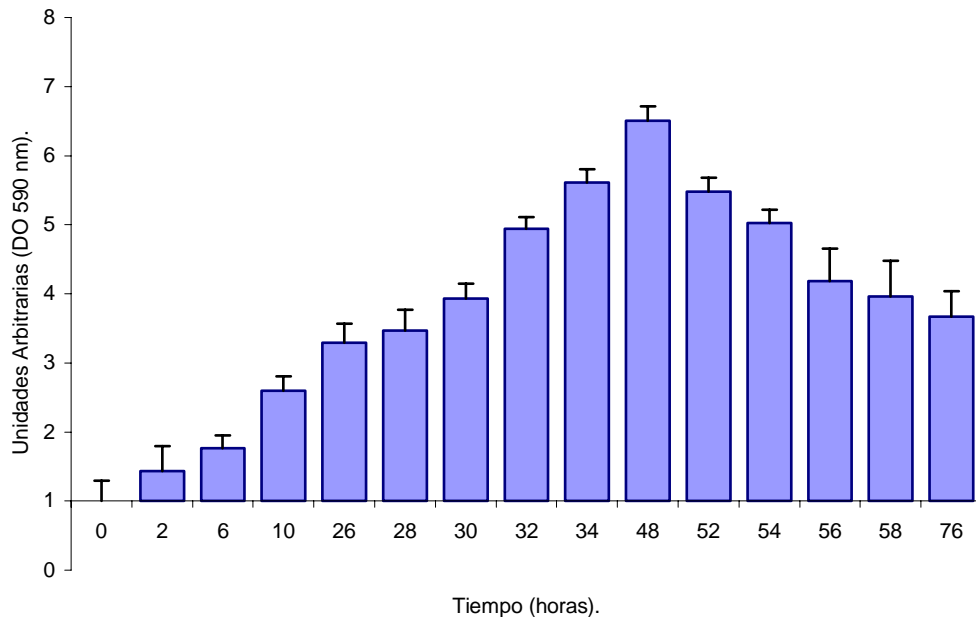


Figura 3.4. **Cinética de formación de biofilm de mutante No. 12 derivada de la cepa de *E. coli* MG1655 a diferentes tiempos de incubación aeróbica.** A) Formación de biofilm a lo largo de la curva de crecimiento bajo condiciones aeróbicas (+O₂). B) Cuantificación del biofilm formado en condiciones aeróbicas. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm en el pozo correspondiente al tiempo 0. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

En cambio para la cepa mutante No. 12 Figura 3.4 la cinética de formación de biofilm difiere del comportamiento de la cepa parental MG1655, debido a que en la mutante No. 12 el pico máximo está a las 48 h de incubación aeróbica y a partir de este punto hay una disgregación del biofilm. Además, se observó una mayor formación de biofilm, es decir, hay más biomasa formada, lo que indica que el biofilm se acumula y se disgrega, pero mantiene la biomasa a través de largos tiempos de incubación.

A)



B)

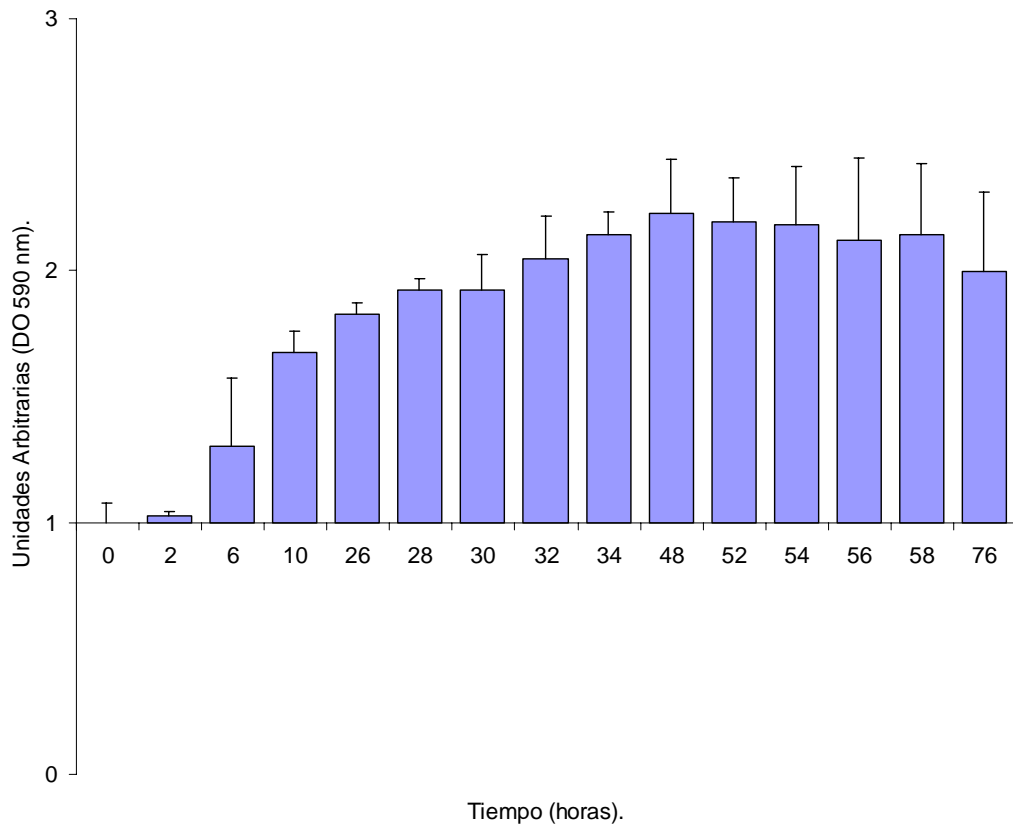


Figura 3.5. **Cinética de formación de biofilm de la mutante No. 17 derivada de la cepa MG1655 de *E. coli* a diferentes tiempos de incubación aeróbica.** A) Formación de biofilm a lo largo de la curva de crecimiento bajo condiciones aeróbicas (+O₂). B) Cuantificación del biofilm formado en condiciones aeróbicas. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm en el pozo correspondiente al tiempo 0. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

En cambio la cinética de formación de biofilm de la mutante No. 17 (Figura 3.5) presenta una formación de biofilm acumulativa, es decir, que el biofilm se mantiene a lo largo de la cinética. Lo que indicaría que el paso de la disgregación de biofilm esta alterado.

Como se observa en la Figura 3.6, las cinéticas de formación de biofilm presentan un comportamiento muy distinto a su cepa parental, lo cual sugiere que el biofilm en presencia de oxígeno es un proceso acumulativo, ya que la cantidad de biofilm formado aumenta conforme el tiempo de incubación y alcanza un punto

máximo a las 32 h para la cepa parental MG1655, y a 48 h para la mutante No. 12 y una acumulación del biofilm en la mutante No. 17. Sin embargo, después de estos máximos de producción de biofilm, la cantidad de biofilm formado disminuye, para el caso de la cepa silvestre y mutante No. 12 lo cual sugiere la disgregación del mismo. Resultados similares han sido observados en *P. fluorescens* (Allison *et al.*, 1998) y en *P. aeruginosa* (Hinsa *et al.*, 2003).

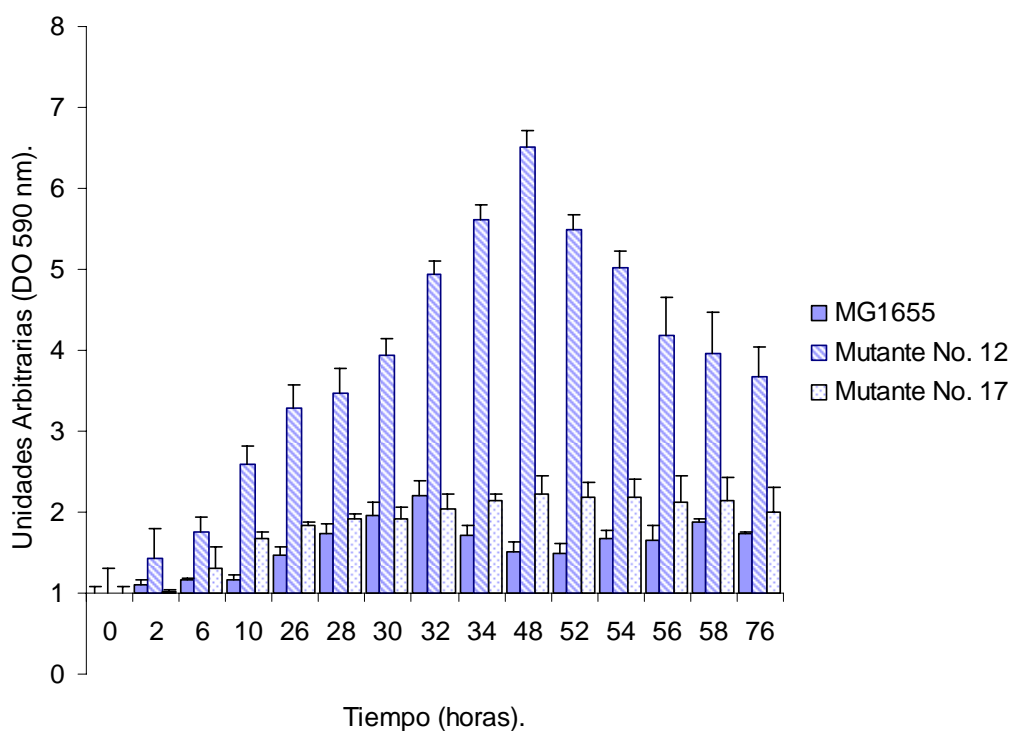


Figura 3.6. **Comparación de las cinéticas de formación de biofilm de la cepa MG1655 y de los dos mutantes No. 12 y No. 17.** Gráfica de la cuantificación del biofilm formado en condiciones aeróbicas. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm en el pozo correspondiente al tiempo 0.

Las tres cepas analizadas (MG1655, mutante No. 12 y mutante No. 17) presentaron cinéticas de formación de biofilm a 37°C muy distintas, lo cual indica que cada cepa responde diferente a su entorno y posiblemente el fenotipo de estas cepas se deba a la mutación ocasionada por la inserción del transposón en el genoma de las mutantes.

3.4.4. Motilidad de las mutantes

En *E. coli* y algunas otras bacterias se ha reportado que la motilidad está mediada por flagelo y que este tipo de desplazamiento es importante en la adhesión inicial a superficies durante el proceso de formación del biofilm (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Watnick *et al.*, 2001; Sheikh *et al.*, 2001). También se sabe que la mayoría de las mutantes aisladas que no forman biofilm aeróbicamente, están afectadas en síntesis de flagelo (Genevaux *et al.*, 1999a; Pratt y Kolter, 1998).

Para determinar si está involucrada la motilidad en una mayor formación de biofilm a 52 h de incubación aeróbica de las mutantes No. 12 y No. 17, se realizaron ensayos de motilidad en placas de agar suave. Se inocularon 2 μ l de un cultivo saturado de la cepa parental MG1655, de las mutantes No. 12 y No. 17; se utilizó como control una cepa deficiente en síntesis de flagelo (ZK408). La motilidad se observa como un halo alrededor del punto de inoculación (Figura 3.7).

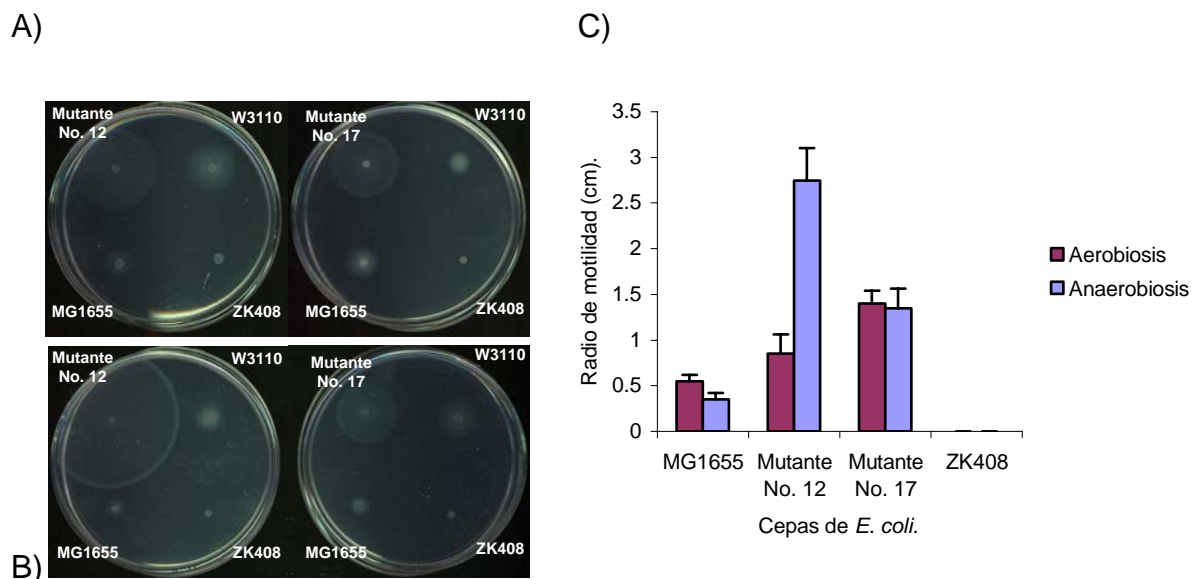


Figura 3.7. **Ensayo de motilidad bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.** A) y B) Fotos del nado de las cepas MG1655, ZK408 (*flhC* 1) y de las mutantes No. 12 y No. 17 en placas de agar suave que se inocularon con 2 μ l de cultivo saturado y se incubaron aeróbicamente y anaeróbicamente por 8 h a 30°C, respectivamente. C) Gráfica de la motilidad de las cepas, de tres experimentos independientes.

Como se observa las mutantes aisladas tienen mayor motilidad que la cepa parental. En la mutante No. 12 se observó un mayor desplazamiento en condiciones anaeróbicas que en presencia de oxígeno, lo que probablemente indique que habría

un inductor bajo esta condición fisiológica o que posiblemente el oxígeno pueda actuar como represor. Entonces el flagelo estaría involucrado en la mayor formación de biofilm de estas mutantes.

3.4.5. Expresión de pili tipo 1 y producción de celulosa de las mutantes

La presencia de pili tipo 1 es el responsable de más del 80% de la formación de biofilm en pozos de microtitulación bajo condiciones aeróbicas. También el pili tipo 1 promueve el crecimiento y adhesión a la interfase aire líquido (Spiers y Rainey, 2005). Por eso, se determinó si las mutantes expresaban este tipo de fimbria por medio de ensayos en placas de rojo Congo. Se utilizó el protocolo como se describió en 2.6.1 de material y métodos.

Como se muestra en la Figura 3.8, hay una diferencia en la expresión del pili tipo 1 y en la producción de celulosa entre las cepas de *E. coli*. Las cepas control TOB1 expresa pili tipo 1 y produce celulosa, la cepa MC4100 expresa pili tipo 1 y la cepa W3110 produce celulosa. Nuestros datos de crecimiento en rojo Congo indican que la cepa silvestre MG1655 expresa pili tipo 1 y las mutantes No. 12 y No. 17 expresan celulosa.

Entonces nuestras mutantes no expresan pili tipo 1, pero si producen celulosa, la cual se sabe forma parte de la estructura que hace que las células se adhieran a las superficies y se establezca el biofilms. Estos datos de expresión y producción diferencial de pili 1 y celulosa se ha observado en diversas *E. coli* (Bokranz *et al.*, 2005).

Estos resultados sugieren que las mutantes aisladas no expresan el pili tipo 1, pero si producen celulosa, lo cual no es decisivo o parte primordial en el mantenimiento del biofilm a las 52 h.

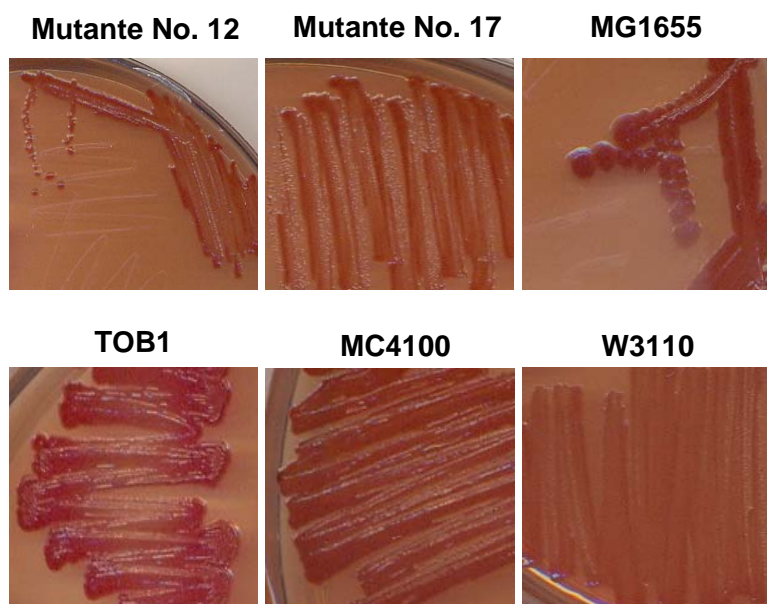


Figura 3.8. **Expresión de fimbria y producción de celulosa de MG1655, TOB1, MC4100 y de los mutantes No. 12 y No. 17.** Crecimiento en placas de agar rojo congo. Se estriaron colonias de las cepas de *E. coli* de cajas de resiembra fresca. Se incubaron a 30°C por 72 h en aerobiosis.

3.4.6. Transducción del fenotipo de las mutantes a MG1566 y W3110

Como se ha descrito en diversos estudios para confirmar que el fenotipo de las mutantes se debe a la inserción del transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> se hizo una transducción de esta mutación al genoma de la cepa parental MG1655 por medio del protocolo 2.7.3 descrito en material y métodos.

Se obtuvieron colonias transducentes de MG1655 con la inserción de Tn5 de la mutante No. 12 [P1_{vir}(mutante No. 12)XMG1655]; W3110 con la inserción de Tn5 de la mutante No. 12 [P1_{vir}(mutante No. 12)XW3110] y MG1566 con la inserción de Tn5 de la mutante No. 17 [P1_{vir}(mutante No. 17)XMG1655].

3.4.7. Formación de biofilm de las transducentes

Para determinar que el fenotipo de mayor formación de biofilm a 52 h es debido a la inserción del transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> se hicieron los ensayos de formación de biofilm como se describe en el apartado 2.5.2 de material y métodos.



Figura 3.9. **Ejemplo de la formación de biofilm de transductantes de la mutante No. 12 en MG1655.** Es una incubación por 52 h a 37°C en condiciones aeróbicas.

Como se observa en la Figura 3.9. la transductante al parecer mantiene el fenotipo de la cepa parental, esto es, la formación de biofilm más robusto que el de la cepa silvestre a las 52 h de cultivo. Por lo que el gen interrumpido por el EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> podría ser el involucrado directamente con el fenotipo de estas mutantes.

3.4.8. Motilidad de las transductantes

Para verificar que en las cepas transductantes se conserven los fenotipos observados en la cepa parental se hizo el ensayo de motilidad a las células transductantes. En la Figura 3.10 se muestra un ejemplo del nado de una transductantes de la mutante No. 12 (se analizaron alrededor de 100 colonias).

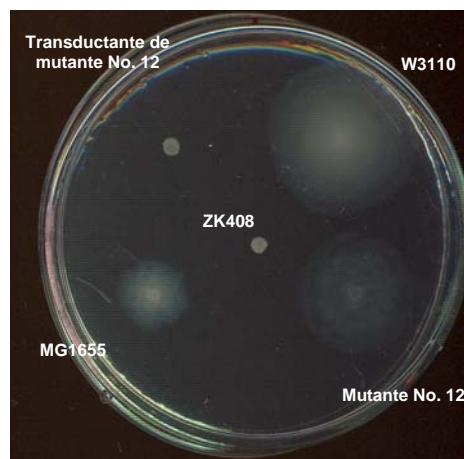


Figura 3.10. **Ensayo de motilidad de la transductante de la mutante No.12 en MG1655.** Fotos del nado la cepa MG1655, W3110, ZK408 (*flhC*, 1), de la mutante No. 12 y de su transductante en placas de agar suave que se inocularon 2 µl de cultivo saturado y se incubaron aeróbicamente por 8 h a 30°C.

Como se observa en la Figura 3.10 ninguna de las transductantes fue móvil, por lo que probablemente para la transductante No.12 existe una mutación adicional que no permite que estas sean móviles, pero que si mantienen el fenotipo de mayor formación de biofilm a 52 h, y sugiere que la motilidad no esta asociada al fenotipo de mayor formación de biofilm.

Fenotipo	Cepa MG1655	Mutante No. 12	Mutante No. 17
Formación de biofilm	+	+	+
Motilidad	+	+	+
Expresión de pili tipo 1	+	-	-
Producción de celulosa	-	+	+

Tabla 3.1. **Resumen de fenotipos de las cepas MG1655 y mutantes No. 12 y 17.**

3.4.9. Mapeo de la inserción del transposon de las mutantes

Con el DNA de la mutante No. 12 (JMH1814) y mutante (No. 17) JMH1819 se mapeo el sitio de inserción del transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2>. Utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Hpa*I, *Kpn*I, *Nco*I, *Pst*I, *Sma*I, *Xba*I se digirió el DNA de las mutantes, se hizo una electroforesis en geles agarosa del DNA y se llevó a cabo un experimento tipo Southern, donde se transfirió el DNA digerido a una membrana de nylon para su posterior hibridación con una región de aprox. 1.2 kb del cassette que confiere la resistencia a kanamicina del plásmido pUC4K. Después del análisis de varias hibridaciones se obtuvo con la enzima *Eco*RI un fragmento de aprox. 12 kb para la mutante No. 12 y de aprox. 16 kb para la mutante No. 17 (Figura 3.11). Para la enzima *Hind*III se obtuvo un fragmento de aprox. 2.5 kb para la mutante No. 12 y de aprox. 15 kb para la mutante No. 17 (Figura 3.11). Para la enzima *Pst*I se obtuvo un fragmento de aprox. 3 kb para la mutante No. 12 y de aprox. 7 kb para la mutante No. 17 (datos no mostrados). Para la enzima *Sma*I se obtuvo un fragmento de aprox. 8 kb para la mutante No. 12 y de aprox. 3 kb para la mutante No. 17 (datos no mostrados). Lo cual indica que las dos mutantes tienen insertado sólo una copia del transposón y éste se encuentra en diferentes sitios del genoma (ver ejemplo en Figura 3.11).

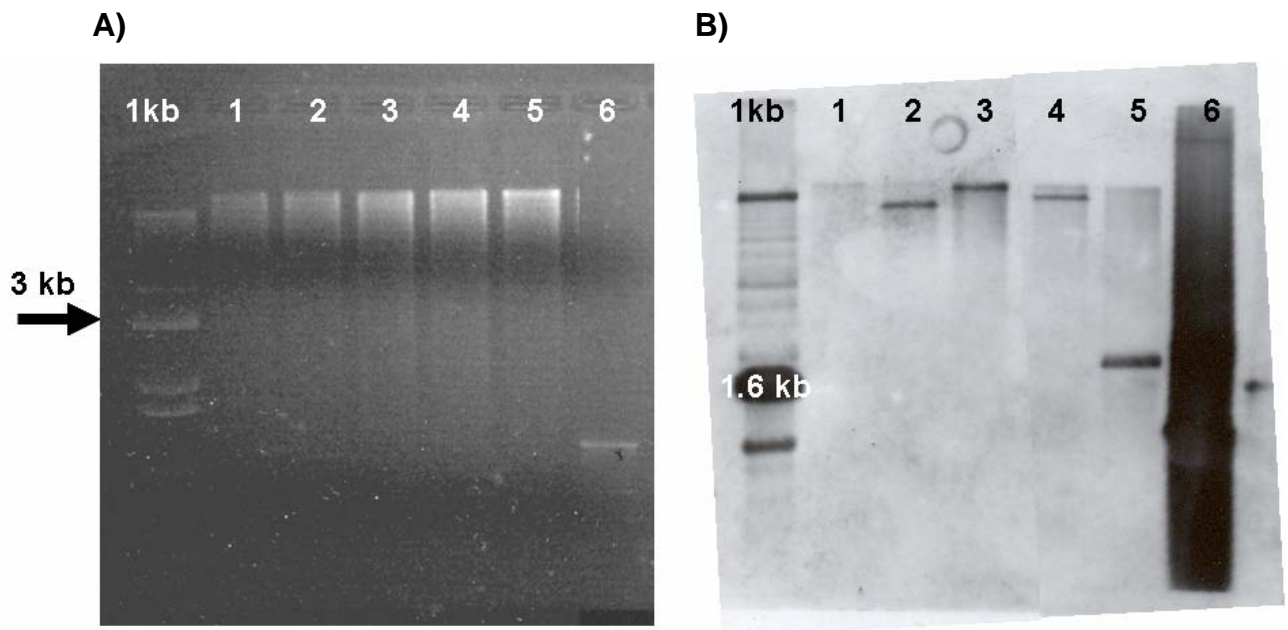
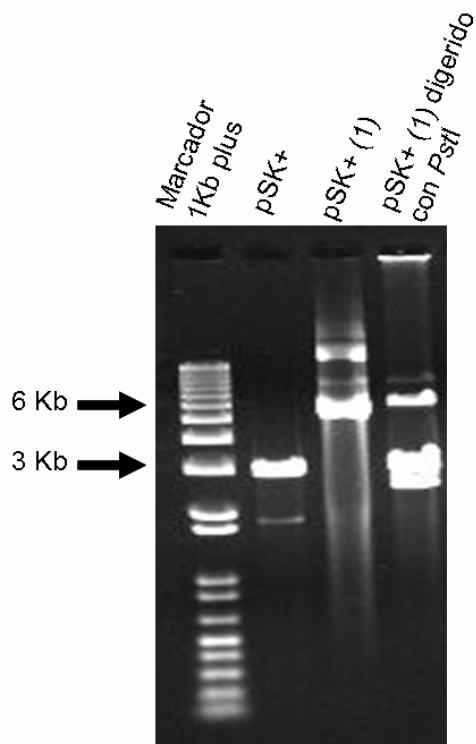


Figura 3.11. **Mapeo de la inserción del transposon de las mutantes No. 12 y No. 17.** A) Gel de agarosa de DNA digerido con las enzimas *EcoRI* (carriles 1 al 3) y *HindIII* (carriles 4 y 5). B) Autoradiografía del experimento de hibridación tipo Southern blot de DNA digerido por enzimas de restricción del panel A, después de la hibridación con el fragmento del cassette de kanamicina del plásmido pUC4K. Cepas analizadas por carril: 1, DNA digerido de cepa MG1655; carriles 2 y 5, DNA digerido de la mutante No. 12; carriles 3 y 4, DNA digerido de la mutante No. 17; carril 6, fragmento de DNA que contiene un cassette de kanamicina.

Para la clonación se utilizaron los fragmentos obtenidos por la digestión con *PstI*. Se utilizaron los plásmidos pBluescriptSK+ y pUC18 digeridos con la enzimas de restricción *PstI* y se ligaron con la enzima DNA ligasa como el experimento descrito en la sección 2.8.6 de material y métodos. Después la ligación se transformó en la cepa XL1-Blue, obteniendo así clonas resistentes a kanamicina y ampicilina. Se obtuvieron clonas a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico. Las clonas Kan^R Amp^R mostraron un tamaño aprox. de (Figura 3.12. panel A). Para verificar que el fragmento *PstI* de 3 kb clonado en los plásmidos contenía al transposon se llevó a cabo unas digestiones con las enzimas *PstI*, *XbaI*, *BamHI* y *HindIII*. Lo cual confirmó que este plásmido denominado psk+(1) contenía el fragmento de 3 kb que contiene el transposon EZ-Tn5TM <T7/KAN-2> y la región de DNA del genoma de la mutante No. 12 donde se inserto (Figura 3.12. panel B).

A)



B)

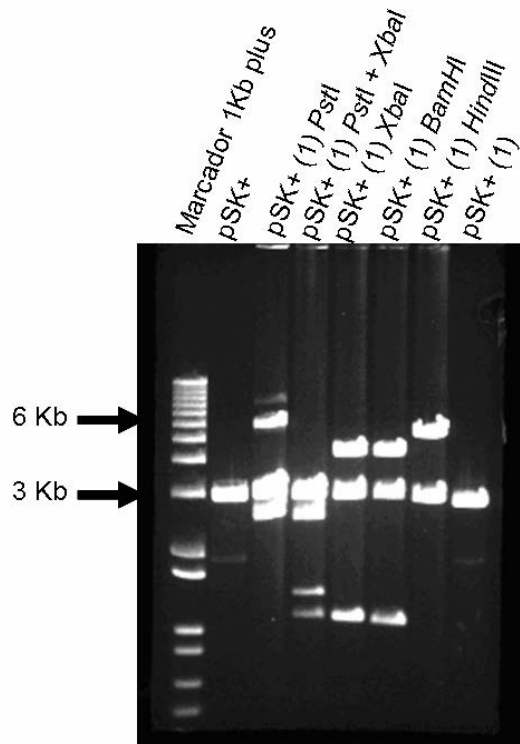


Figura 3.12. **Análisis de restricción del plásmido pSK+ *psf***. A) Clona que contiene el plásmido pSK+ más el inserto. B) Digestiones del plasmido pSK+ (1) para confirmar la clonación del inserto.

3.4.10. Secuenciación

El plásmido pSK+(1) con el fragmento *PstI* de 3 kb de la mutante No. 12 se secuenció utilizando el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Fisiología Celular utilizando los oligonucleótidos M13 -21 y M13 Rev con los cuales se obtuvo una secuencia de 491 y 717 pb respectivamente.

El análisis de secuencia no pudo llevarse a cabo debido a que contenía errores como la aparición constantemente de bases sin definir. Por lo cual, la naturaleza de la mutación aún se desconoce.

4. RESULTADOS

“ANÁLISIS DE CEPAS DE *E. COLI* AISLADAS DE DIFERENTES AMBIENTES”

4.1. Razonamiento de los experimentos

En estudios previos en nuestro laboratorio, se indicaron que *E. coli* W3110 a pesar de ser un organismo facultativo y que puede crecer utilizando aceptores alternos al oxígeno, no es capaz de formar biofilm en condiciones anaeróbicas (Colón-González *et al.*, 2004).

Por lo que en ausencia de oxígeno diferentes cepas de laboratorio de *E. coli* K-12 no son capaces de formar biofilm bajo ninguna condición de temperatura, nutrientes, aceptores alternos de electrones o incluyendo el sobrenadante del medio de cultivo obtenido de la diferentes fases del cremiento (Colón-González *et al.*, 2004). En condiciones aeróbicas la formación de biofilm se observa como un anillo alrededor de la interfase aire-líquido, por lo que se ha sugerido que el oxígeno juega un papel importante durante el proceso de formación y disgregación del biofilm (Colón-González *et al.*, 2004).

4.2. Estrategia experimental

4.2.1. Selección de cepas ambientales de *E. coli* capaces de formar biofilm en aerobiosis y anaerobiosis

La posibilidad de que alguna cepa de *E. coli* aislada del ambiente pudiera establecer un biofilm en condiciones anaeróbicas fue probada utilizando 77 cepas provenientes de una colección de más de 5 000 cepas de *E. coli* aisladas de diversas fuentes ambientales (colección de la Dra. Valeria Souza del instituto de Ecología, UNAM). Se observó la formación el biofilm en diferentes condiciones por medio del ensayo de formación de biofilm que se describe en sección 2.5.2. En las tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 se presenta el estudio de estas 77 cepas. Los datos muestran la capacidad de la formación de biofilm en diferentes medios, en presencia y ausencia de oxígeno.

Tabla 4.1. Formación de biofilm en presencia de oxígeno de cepas de *E. coli*.

Cepa	Aislada de	Formación de biofilm				
		M1	M2	M3	M4	M5
Souza2	Perro	+	++	+	+++	+
Souza20	Ratón	++	++	++	+	-
Souza33	Murciélago	+++	++	++	+++	+++
Souza36	Murciélago	-	+	+	+	++
Souza42	Murciélago	+	+	+	+++	+
Souza45	Humano	-	+	-	-	-
Souza55	Pájaro	+	++	-	+	-
Souza57	Tortuga	+	-	-	+	-
Souza68	Ratón	-	+	+	++	-
Souza78	Ratón	-	++	+	++	+
Souza82	Conejo	+	-	-	+	-
Souza95	Ratón	-	+	-	+	-
Souza161	Pájaro	-	-	-	+	-
Souza268	Puma	+	+	+	+	+
Souza270	Jaguar	+	+	+	+	+
Souza271	Jaguar	+	+	+	+	+
Souza272	Zorro	+	+	+	+	+
Souza273	Coyote	+	+	+	+	+
Souza287	Ratón	+	++	++	+++	+++
Souza288	Ratón	+	++	++	+++	+++
Souza298	Ratón	++	++	+++	+++	+++
Souza815	Comadreja	++	+	+	+	-
Souza820	Ratón	+	+	+	++	++
Souza825	Coyote	+	+	+	-	-
Souza830	Coyote	+	++	+	-	-
Souza1639	Mono	+	+	-	-	-
Souza1684	Murciélago	+	+	-	-	-
Souza1698	Zarigüeya	+	+	-	-	-
Souza1744	Oso hormiguero	+++	+++	+++	+++	+++
Souza1967	Borrego	+	+	++	+	++
Souza2055	Pecari	+	-	+	++	+
Souza2110	ECOR 30	+	++	++	++	+++
Souza2165	Humano	+	+	-	-	-
Souza2274	Babuino	+	-	-	-	-
Souza2339	Australia raton	+	+	-	-	-
Souza2382	Tapir	+++	+++	++	+++	+++
Souza3517	Humano	+	-	-	-	-
Souza3635	Humano	+	+	+	-	-

M1= LB MOPS 100 mM pH 7.0; M2= LB MOPS adicionado con nitrato de sodio 1 mM; M3= LB MOPS adicionado con glucosa 0.2%; M4= M63B1; M5= M63B1 MOPS. (-)= ausencia de formación de biofilm; (+)= poca formación de biofilm de 1 a 4 UA_{590nm}; (++) formación de biofilm de 4 a 9 UA_{590nm}; (+++)= mucha formación de biofilm de 9 UA_{590nm} o más. ECOR 30= aislado de humano

Tabla 4.2. Formación de biofilm en presencia de oxígeno de cepas de *E. coli*.

Cepa	Aislada de	Formación de biofilm				
		M1	M2	M3	M4	M5
Souza3638	UTI	++	++	++	+	++
Souza3639	UTI	-	-	-	-	-
Souza3640	UTI	+	-	-	-	-
Souza3641	ETEC	-	++	-	+	++
Souza3642	Suelo Tlalpan UTI	+	-	-	-	-
Souza3643	UTI	-	-	-	-	-
Souza3655	EHEC	-	-	+	+	-
Souza3659	Humano	+	++	++	-	+
Souza3679	Lodo río Remedios	++	-	+++	++	++
Souza3681	Humano	+	-	++	-	+
Souza3682	Humano	-	-	-	+++	++
Souza3693	Humano	++	+	+	+	+
Souza3707	Humano	++	+	-	+	-
Souza3708	Lodo río Remedios	++	++	++	-	-
Souza3839	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3840	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3841	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3872	Lodo río Remedios	+++	+++	+++	+++	+++
Souza3873	Lodo río Remedios	+++	+++	+++	+++	+++
Souza3874	Lodo río Remedios	+++	+++	+++	+++	+++
Souza3875	Lodo río Remedios	-	-	-	-	-
Souza3876	Lodo río Remedios	+++	+++	++	+++	+++
Souza3877	Lodo río Remedios	++	++	+++	+++	+++
Souza3878	Lodo río Remedios	++	++	+++	+	++
Souza3879	Lodo río Remedios	++	++	+	++	++
Souza3880	Lodo río Remedios	+++	+++	++	+++	+++
Souza3881	Lodo río Remedios	+++	+++	+++	+++	+++
Souza3882	Lodo río Remedios	-	-	-	-	-
Souza3883	Lodo río Remedios	+++	+++	+++	++	+++
Souza3884	Lodo río Remedios	+	++	+	+	+
Souza4981	Humano	++	++	+	-	-
Souza5026	Humano	+	-	-	-	-
Souza5027	Humano	-	-	-	+	-
Souza5063	Humano	+	-	-	+	-
Souza5069	UTI	-	-	-	-	-
Souza5070	UTI	+++	+++	++	+++	++
Souza5071	UTI	-	-	-	+	+
Souza5072	Humano	+	+	++	-	-
Souza5074	Humano	+	++	+	+	+
W3110		++	++	++	+++	+++
ZK408		-	-	-	-	-

M1= LB MOPS 100 mM pH 7.0; M2= LB MOPS adicionado con nitrato de sodio 1 mM; M3= LB MOPS adicionado con glucosa 0.2%; M4= M63B1; M5= M63B1 MOPS. (-)= ausencia de formación de biofilm; (+)= poca formación de biofilm de 1 a 4 UA_{590nm}; (++) formación de biofilm de 4 a 9 UA_{590nm}; (+++)= mucha formación de biofilm de 9 UA_{590nm} o más. UTI=uropatogénica; ETEC=enterotóxica; EHEC=enterohemorrágica.

Como se observa en las tabla 4.1 y 4.2, la formación de biofilm en condiciones aeróbicas de las cepas analizadas en los medios M1 (LB MOPS), M2 (LB MOPS adicionado con nitrato de sodio) y M3 (LB MOPS adicionado con glucosa), nos muestra que de las 77 cepas 12 cepas (15.5%) no forman biofilm en los medios M1, M2 y M3, por lo que el medio LB no permite el establecimiento del biofilm, aún adicionando aceptores alternos de electrones como el nitrato y glucosa. En cambio existen otras 40 cepas (51.9%) forman biofilm en los medios M1, M2 y M3. De todas las cepas analizadas 8 cepas (10.3%) solo forman biofilm en M1 y no en otro medio, otras 3 cepas (3.8%) solo forman biofilm en M2 y solo una cepa (1.2%) forma biofilm en M3. Analizando en grupos hay otras 7 cepas (9%) que forman biofilm en M1 y M2; otras 3 cepas (3.8%) que solo forman biofilm en M1 y M3 pero no en M2 y otras 3 cepas (3.8%) que solo forman biofilm en M2 y M3, pero no en M1.

También se observó la capacidad de formación de biofilm de las 77 cepas de *E. coli* en LB de las cuales 58 cepas formaron biofilm y 19 no son capaces de establecer un biofilm en este medio (O'Toole *et al.*, 2000). Cuando el medio LB es adicionado con nitrato existen 53 cepas que forman biofilm y 24 que no forman el biofilm. En cambio cuando el medio LB contiene glucosa, existen 47 cepas que forman el biofilm y 30 que no establecen un biofilm.

Se ha descrito que la formación de biofilm depende de factores ambientales y se ha reportado que en medio mínimo la formación de biofilm no se ve favorecida. Cuando se analizó la capacidad de formar un biofilm de las 77 cepas en medio mínimo M63B1 con y sin MOPS, se observó que 38 cepas (49.3%) formaron biofilm en medio mínimo M4 y M5. También se observó que 25 cepas (32%) no formaron biofilm en M4 y M5, que existen 12 cepas (15.5%) que solo formaron biofilm en medio mínimo (M4) y solo 2 cepas hicieron biofilm en el medio mínimo adicionado con MOPS (M5).

Se observó que 50 cepas si establecen un biofilm en medio mínimo y que 27 cepas no lo establecen. En cambio cuando se adiciona el MOPS el número de cepas que establecen el biofilm baja a 40 y las que no lo establecen sube a 37 cepas.

Cabe mencionar que existen 8 cepas que no forman biofilm en ningún medio y son 3 cepas identificadas como UTI's, 3 cepas aisladas de Lodo del Gran Canal y 2 cepas aisladas del lodo del río Remedios.

Tabla 4.3. Formación de biofilm en ausencia de oxígeno de cepas de *E. coli*.

Cepa	Aislada de	Formación de biofilm				
		M1	M2	M3	M4	M5
Souza2	Perro	-	++	-	-	++
Souza20	Ratón	-	++	-	-	-
Souza33	Murciélago	-	-	-	-	-
Souza36	Murciélago	-	-	-	-	-
Souza42	Murciélago	-	-	++	-	-
Souza45	Humano	-	-	++	-	-
Souza55	Pájaro	-	-	++	-	-
Souza57	Tortuga	-	-	++	-	-
Souza68	Ratón	-	++	-	-	-
Souza78	Ratón	-	-	++	-	-
Souza82	Conejo	-	-	-	-	-
Souza95	Ratón	-	-	-	-	-
Souza161	Pájaro	-	-	-	-	-
Souza268	Puma	-	++	+	-	-
Souza270	Jaguar	-	-	++	-	-
Souza271	Jaguar	-	-	++	-	-
Souza272	Zorro	-	++	-	-	+
Souza273	Coyote	-	++	-	-	++
Souza287	Ratón	-	++	++	-	-
Souza288	Ratón	-	++	++	-	-
Souza298	Ratón	+	+++	++	++	++
Souza815	Comadreja	-	-	-	-	-
Souza820	Ratón	-	-	++	-	-
Souza825	Coyote	-	-	++	-	-
Souza830	Coyote	-	-	-	-	-
Souza1639	Mono	-	-	-	-	-
Souza1684	Murciélago	-	-	-	-	-
Souza1698	Zarigüeya	-	++	-	-	-
Souza1744	Oso hormiguero	-	++	++	+	-
Souza1967	Borrego	-	++	++	-	-
Souza2055	Pecari	-	-	-	-	-
Souza2110	ECOR 30	+	++	+	++	++
Souza2165	Humano	-	++	-	-	-
Souza2274	Babuino	-	-	-	-	-
Souza2339	Australia raton	-	-	++	-	-
Souza2382	Tapir	++	++	++	+++	+++
Souza3517	Humano	-	-	++	-	-
Souza3635	Humano	-	-	-	-	-

M1= LB MOPS 100 mM pH 7.0; M2= LB MOPS adicionado con nitrato de sodio 1 mM; M3= LB MOPS adicionado con glucosa 0.2%; M4= M63B1; M5= M63B1 MOPS. (-)= ausencia de formación de biofilm; (+)= poca formación de biofilm de 1 a 4 UA_{590nm}; (++) formación de biofilm de 4 a 9 UA_{590nm}; (+++)= mucha formación de biofilm de 9 UA_{590nm} o más. ECOR 30= aislado de humano.

Tabla 4.4. Formación de biofilm en ausencia de oxígeno de cepas de *E. coli*.

Cepa	Aislada de	Formación de biofilm				
		M1	M2	M3	M4	M5
Souza3638	UTI	-	-	-	-	-
Souza3639	UTI	-	-	-	-	-
Souza3640	UTI	-	-	-	-	-
Souza3641	ETEC	-	-	-	-	-
Souza3642	Suelo Tlalpan UTI	++	+	-	+	-
Souza3643	UTI	-	-	-	-	-
Souza3655	EHEC	-	-	-	-	-
Souza3659	humano	-	-	-	-	-
Souza3679	Lodo río Remedios	++	-	-	++	-
Souza3681	Humano	-	-	-	-	-
Souza3682	Humano	-	-	-	-	-
Souza3693	Humano	-	++	++	-	-
Souza3707	Humano	-	-	-	-	-
Souza3708	Lodo río Remedios	++	-	-	-	-
Souza3839	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3840	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3841	Lodo Gran Canal	-	-	-	-	-
Souza3872	Lodo río Remedios	++	++	++	+++	+++
Souza3873	Lodo río Remedios	++	++	++	+++	+++
Souza3874	Lodo río Remedios	++	++	++	+++	+++
Souza3875	Lodo río Remedios	-	-	-	-	-
Souza3876	Lodo río Remedios	++	++	++	+++	+++
Souza3877	Lodo río Remedios	++	++	-	-	++
Souza3878	Lodo río Remedios	++	-	-	++	-
Souza3879	Lodo río Remedios	-	-	-	++	-
Souza3880	Lodo río Remedios	++	++	+	+	+++
Souza3881	Lodo río Remedios	-	+	+	++	++
Souza3882	Lodo río Remedios	-	-	-	-	-
Souza3883	Lodo río Remedios	+	+	-	++	+
Souza3884	Lodo río Remedios	+	+	-	++	+
Souza4981	Humano	-	-	-	-	-
Souza5026	Humano	-	-	-	-	-
Souza5027	Humano	-	-	-	-	-
Souza5063	Humano	-	-	-	-	-
Souza5069	UTI	-	-	-	-	-
Souza5070	UTI	++	+	-	-	-
Souza5071	UTI	-	-	-	-	-
Souza5072	Humano	-	++	++	-	-
Souza5074	Humano	-	++	-	-	-
W3110		-	-	-	-	-
ZK408		-	-	-	-	-

M1= LB MOPS 100 mM pH 7.0; M2= LB MOPS adicionado con nitrato de sodio 1 mM; M3= LB MOPS adicionado con glucosa 0.2%; M4= M63B1; M5= M63B1 MOPS. (-)= ausencia de formación de biofilm; (+)= poca formación de biofilm de 1 a 4 UA_{590nm}; (++) formación de biofilm de 4 a 9 UA_{590nm}; (+++)= mucha formación de biofilm de 9 UA_{590nm} o más UTI=uropatogénica; ETEC=enterotóxica; EHEC=enterohemorrágica.

Se analizó la formación de biofilm en ausencia de oxígeno de las 77 cepas de *E. coli*, los resultados se muestran en las tablas 4.3 y 4.4. Analizando la capacidad de formación de biofilm en el medio LB, hay 33 cepas (48.8%) que no forman biofilm en los medios M1, M2 y M3, pero si en algún otro medio. Se observó que 9 cepas (11.6%) formaron biofilm en condiciones anaeróbicas en los tres medios M1, M2 y M3. También otras 3 cepas (3.8%) formaron biofilm solo en M1; otras 8 cepas (10.3%) sólo formaron biofilm en M2 y otras 11 cepas (14.2%) formaron biofilm en M3. También otras 5 cepas (6.4%) formaron biofilm en M1 y M2 pero no en M3; y otras 8 cepas (10.3%) formaron biofilm en M2 y M3 pero no en medio M1.

Analizando la capacidad de formación de biofilm en ausencia de oxígeno de las 77 cepas de *E. coli* en LB, se encontro que en LB MOPS solo 16 cepas establecieron un biofilm y 61 no formaron el biofilm. Para él medio LB MOPS adicionado con sodio y el adicionado con glucosa el número de cepas que establecieron un biofilm aumento a 27 y 50 cepas que no hicieron el biofilm en ausencia de oxígeno.

Esta formación de biofilm diferencial en los diferentes medios utilizados nos indica que los factores ambientales, como la presencia de nitrato y glucosa, hacen que se modifique el establecimiento del biofilm, además de las particularidades de cada cepa analizada.

En cambio, cuando se analizó la capacidad de formar biofilm en ausencia de oxígeno en medio mínimo se observó que 56 cepas (72.7%) no formaron biofilm en los dos medios analizados M4 y M5: pero 12 cepas (15.5%) sí formaron biofilm en M4 y M5. Existen 5 cepas (6.4%) que sólo formaron biofilm en M4 y otras 4 cepas (5.1%) que solo formaron biofilm en M5.

En medio mínimo es más difícil soportar la forma de vida del biofilm en los pozos de microtitulación, lo que concuerda con datos ya descritos. Pero 20% de las cepas si establecieron un biofilm en medio mínimo, aunque la presencia de MOPS en el medio de cultivo puede alterar o promover el biofilm.

4.3. Formación de biofilm de *E. coli* ambientales

Después de análisis de las 77 cepas, se decidió tomar una muestra de cepas que formaron biofilm en los cinco medios tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las cepas fueron Souza33 (solo hace biofilm en aerobiosis), Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876. En la Figura 4.1 se muestra un ejemplo de la formación de biofilm en condiciones aeróbicas en pozos de PVC. También en el artículo anexo se muestra el ejemplo de la formación de biofilm en condiciones anaeróbicas de estas mismas cepas.

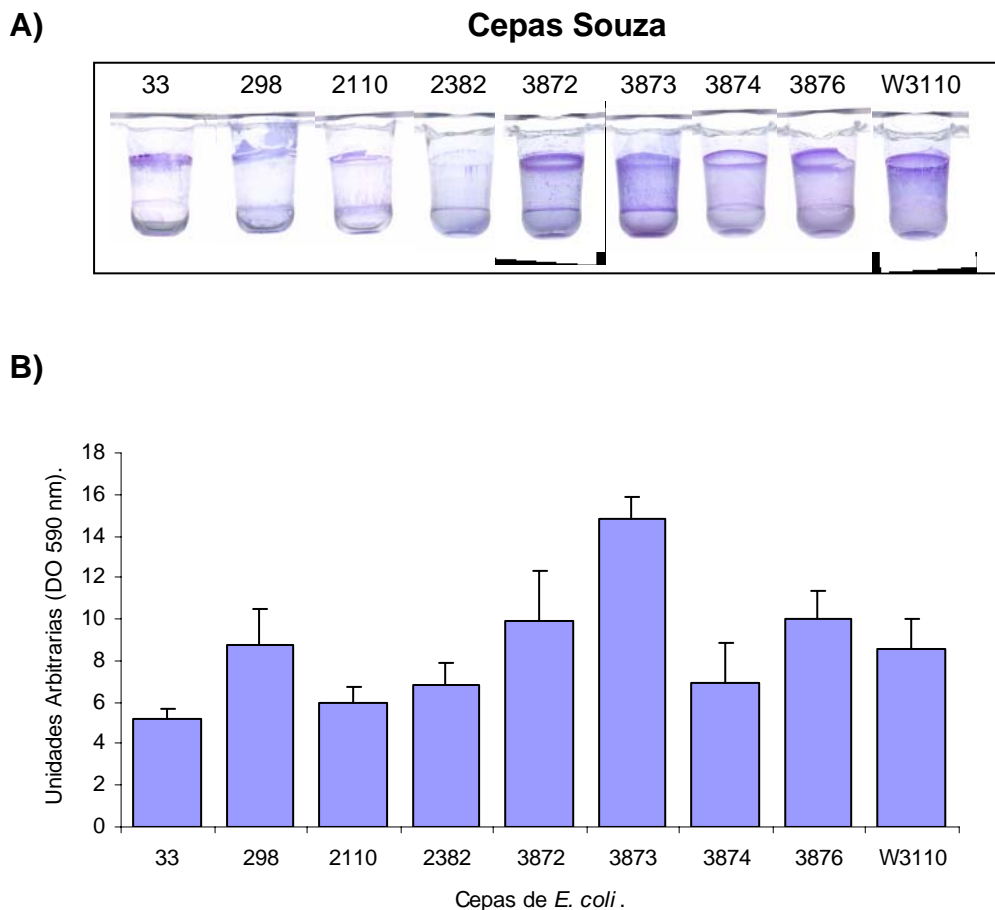
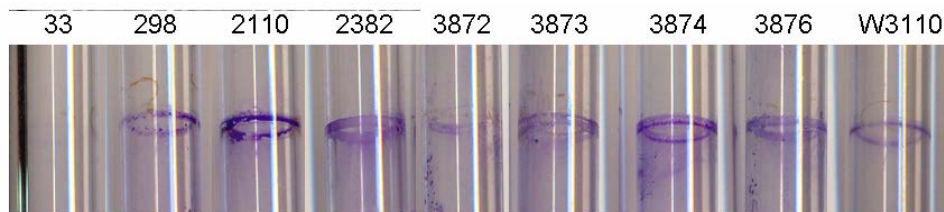


Figura 4.1. **Formación de biofilm de 7 cepas de *E. coli* aisladas del ambiente.** A) Formación de biofilm en LB MOPS 100 mM adicionado con glucosa 0.2% a 30°C incubados por 24 h. B) Cuantificación del biofilm formado del panel A.

La formación de biofilm se observa como el anillo en la interfase-aire líquido, pero también se observa que el biofilm se formó en toda la superficie del pozo, lo cual ya ha sido reportado (Castonguay *et al.*, 2005). La cuantificación del biofilm nos muestra que cada cepa es diferente y que varía de acuerdo al lugar de donde fueron aisladas.

Se ha descrito a lo largo de la literatura, que el biofilm es una comunidad adherida a superficies, ya sea de naturaleza hidrofóbico o hidrofílica. Para el caso de los pozos de microtitulación que son superficies hidrofóbicas, el fenotipo de formación de biofilm también varía de acuerdo a la superficie, por lo que se analizó la capacidad de formar biofilm en vidrio (Figura 4.2).

A)



B)

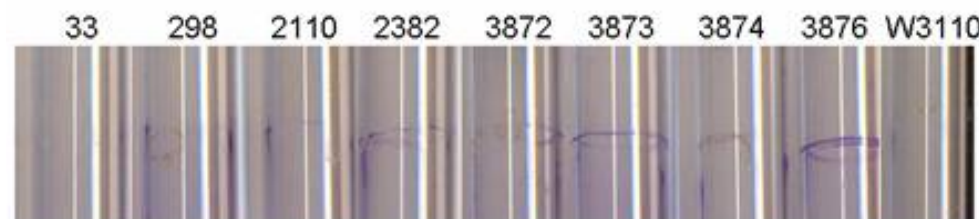


Figura 4.2. **Formación de biofilm en vidrio de las cepas ambientales de *E. coli*.** A) Formación de biofilm en LB MOPS 100 mM a 30°C por 24 horas en condiciones aeróbicas. B) Formación de biofilm en LB MOPS 100 mM a 30°C por 48 horas en condiciones anaeróbicas.

Como se observa en la Figura 4.2 bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas se confirma el fenotipo de formación de biofilm como un anillo en la interfase-aire líquido. Cabe señalar que también se observó este fenotipo a 37°C y en diferentes medios de cultivo (datos no mostrados).

4.4. Secuencias del 16S

Se utilizaron los oligonucleotidos descritos en la sección 2.8.9 de material y métodos para obtener productos de PCR, los cuales se purificaron de gel y se secuenciaron con los oligonucleotidos internos del gen 16S descritos por Sacchi *et al.*, (2002). Se obtuvieron las secuencias de las cepas Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876. Las cuales al ser comparadas con el banco de secuencias de genes se observó una identidad del 99% con el gen 16S de diversos tipos de *E. coli*. Aunado a esto y con los datos bioquímicos (datos no mostrados, generados en el laboratorio de la Dra. Valeria Souza) se tiene la certeza de que son cepas de esta especie.

4.5. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* ambientales

Para ver el comportamiento del crecimiento de las células bajo condiciones anaeróbicas se determinó la curva de crecimiento de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 (Figura 4.3).

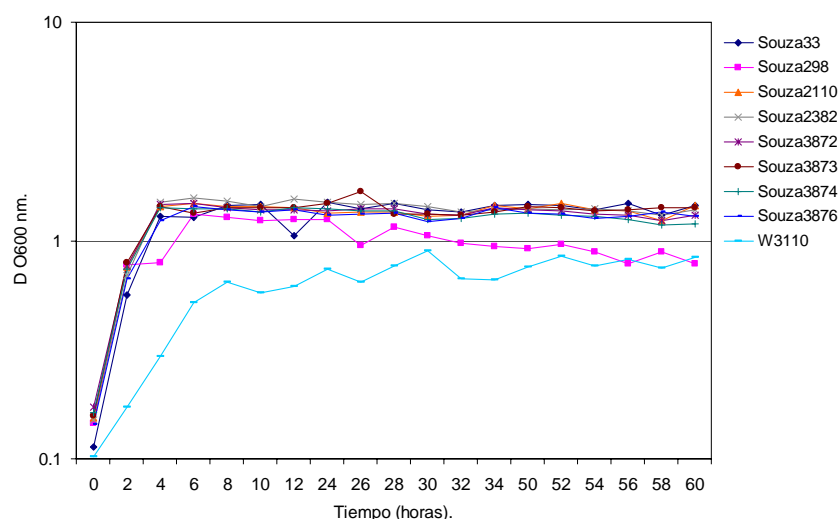


Figura 4.3. **Cinéticas de crecimiento.** En condiciones anaeróbicas en pozos de PVC en LB glucosa 0.2% adicionado con nitrato de sodio 1 mM. a 30°C.

Como se observa en la Figura 4.3 las curvas de crecimiento de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 son muy similares. Las cinéticas de crecimiento alcanzan la fase estacionaria entre las 4 y 8 horas y mantienen una DO_{600nm} similar hasta las 60 h. La cepa Souza298 tiene una velocidad de crecimiento baja ya que llega a fase estacionaria y decae su DO_{600nm} . La cepa control W3110 presenta una menor DO_{600nm} y su crecimiento es mas lento, aunque mantiene la curva de crecimiento hasta alcanzar a Souza298. Cabe señalar que las cinéticas de crecimiento de estas cepas también mostro el mismo comportamiento cuando las DO provienen de cultivo en crecimientos de matraces (datos no mostrados).

4.6. Cinéticas de la formación biofilm de *E. coli* ambientales

Como se observo en *E. coli* W3110 en ausencia de oxígeno no hay formación de biofilm. En las cepas Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 se observó la formación de biofilm en condiciones anaeróbicas por lo que se determinó la cinética de formación de biofilm en ausencia de oxígeno. Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describe en material y métodos, se utilizaron cultivos de las cepas ambientales Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 y de la cepa *E. coli* W3110 en medio LB MOPS 100 mM pH 7.0. Se inocularon placas de microtitulación que se incubaron a 30°C bajo condiciones anaeróbicas. La detección del biofilm se llevó a cabo mediante tinción con cristal violeta y la cantidad del biofilm formado se cuantificó eluyendo el colorante con una solución 80% etanol 20% acetona. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm del colorante eluido al tiempo 0. Los datos obtenidos con la cepa Souza298 se muestran en la Figura 4.4.

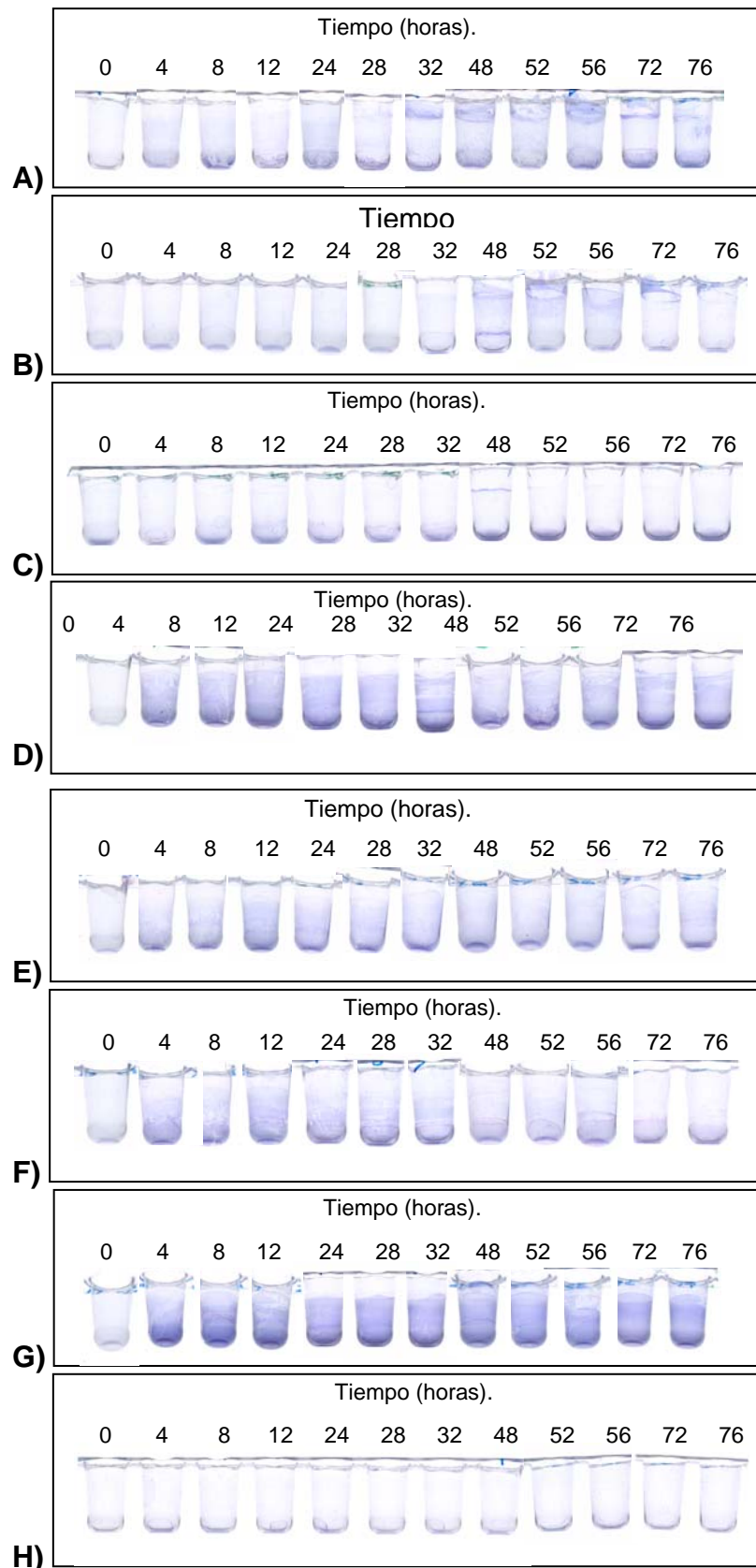


Figura 4.4. **Cinética de formación de biofilm en condiciones anaeróbicas.** En LB MOPS 100 mM pH 7.0 con glucosa 0.2% y nitrato de sodio 1 mM, a 30°C. Cepas Souza A) 298, B) 2110, C) 2382, D) 3872, E) 3873, F) 3874, G) 3876 y H) cepa control W3110.

La cinética de formación de biofilm de Souza298 Figura 4.4. panel A, inicia a las 4 h con una adherencia, a partir de las 32 h se forma un biofilm como un anillo en la interfase-aire liquido el cual se mantiene hasta los 76 h. La formación de biofilm de Souza2110 Figura 4.4, panel B, inicia a las 32 h al observarse un biofilm como anillo en la interfase aire-liquido y a partir de este alcanza un máximo y empieza a decaer. Como se muestra en la Figura 4.4, panel C, la formación de biofilm de Souza2382 se mantiene durante la cinética y alcanza un máximo de producción de biofilm a las 48 h.

La formación de biofilm de las cepas Souza3872, Souza3873 y Souza3874 Souza3876, Figura 4.4, panel D, E, F y G respectivamente, durante la cinética se mantuvo desde las 4 h de incubación hasta los 76 h, el biofilm se observo en todo el pozo. Como se ha reportado anteriormente, no hubo formación de biofilm en condiciones anaeróbicas de la cepa control W3110 (Figura 4.4, panel H).

4.7. Motilidad de las cepas de *E. coli* aisladas del medio ambiente

Para observar los diferentes tipos de motilidades se analizó la capacidad de nadar o “swimming” o, de pupular o “swarming” y de crisparse o “twitching”, de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado 2.5.5 de material y métodos. El swimming se presenta en medios fluidos y las células de la población no muestran un patrón particular. En contraste, el desplazamiento denominado swarming se presenta sobre una superficie donde las células generalmente sufren una diferenciación morfológica hacia formas elongadas e hiperflagelados y estos presentan movimientos coordinados. El twitching es una forma de translocación en una superficie sólida en donde el patrón morfológico es menos organizado que en el swarming. El swimming y swarming es coordinado por el flagelo y el twitching depende del pili tipo IV (esto ha sido especialmente descrito *Pseudomonas aeruginosa*) (Rashid y Kornbeng, 2000).

Las condiciones para el swimming fueron en ausencia y presencia de glucosa. Las cajas fueron deshidratadas por una noche. Para el ensayo de swimming (0.3% de agar) se inocularon 2 µl de un cultivo saturado de cada cepa. Para el swarming (0.5% de agar) y twitching (1% de agar) se tomo una colonia con un palillo y se introdujo en el agar hasta el fondo de la caja. Para swimming y swarming se

incubaron a 30°C por 8 h y 14 h, respectivamente, para el twitching se incubaron a 37°C por 24 h, todo en presencia y ausencia de oxígeno.

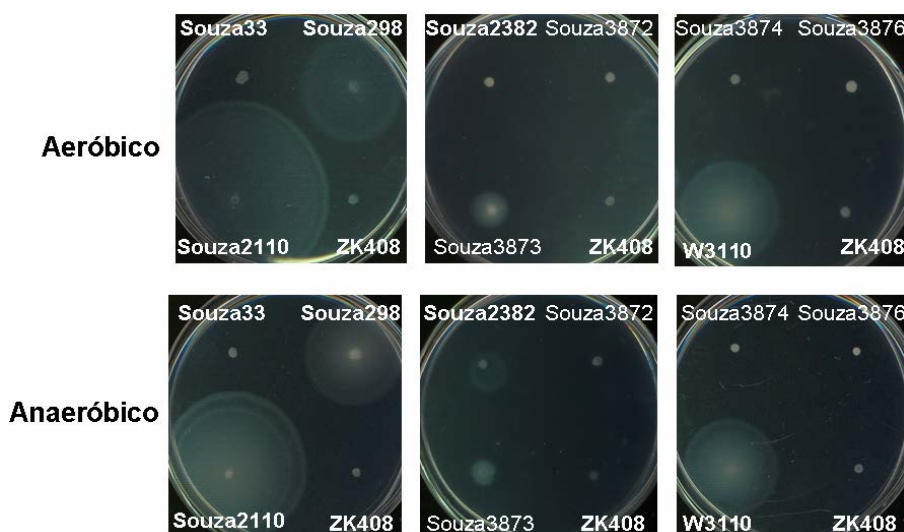


Figura 4.5. **Ensayo de motilidad bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.** Fotos del nado de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876, W3110 y ZK408 (*flhC*) en placas de agar suave que se inocularon 2 µl de cultivo saturado e incubadas aeróbicamente y anaeróbicamente por 8 h a 30°C.

Tabla 4.5. **Presencia de motilidad tipo swimming en cepas de *E. coli***

Cepas	Sin glucosa		
	30°C	30°C	37°C
	Aeróbico	Anaeróbico	Aeróbico
Souza33	-	-	-
Souza298	+	+	+
Souza2110	+	+	-
Souza2382	-	+	-
Souza3872	-	-	-
Souza3873	+	+	-
Souza3874	-	-	-
Souza3876	-	-	-
W3110	+	+	+

(+)=presencia
(-)=ausencia

El nado o swimming de las cepas de *E. coli* fue diferente por la presencia o ausencia de glucosa. Como se observa en la Figura 4.5 las cepas Souza33, Souza3872, Souza3874 y Souza3876 no son mótils bajo ninguna condición. Las cepas Souza298 y W3110 son mótils en todas las condiciones, en cambio la cepa Souza2382 sólo es mótil en condiciones anaeróbicas y la cepa Souza2110 sólo es mótil a 30°C (Tabla 4.5). Cabe señalar que el halo de motilidad es definido en aerobiosis y difuso para la cepa Souza298 y W3110 en anaerobiosis (Figura 4.5).

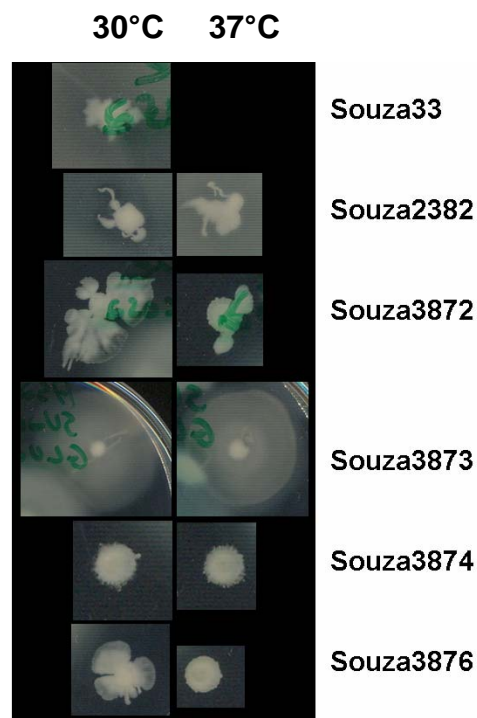


Figura 4.6. **Ensayo de motilidad bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas en presencia de glucosa.** Fotos del nado de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876, W3110 y ZK408 (*flhC*) en placas de agar suave que se inocularon 2 µl de cultivo saturado e incubadas aeróbicamente y anaeróbicamente por 8 h a 30°C.

Tabla 4.6. **Presencia de motilidad tipo swimming en presencia de glucosa de cepas de *E. coli*.**

Cepas	Con glucosa		
	30°C	30°C	37°C
	Aeróbico	Anaeróbico	Aeróbico
Souza33	+	Nd	-
Souza298	+	Nd	+
Souza2110	+	Nd	+
Souza2382	+	Nd	+
Souza3872	+	Nd	+
Souza3873	+	Nd	+
Souza3874	-	Nd	-
Souza3876	+	Nd	-
W3110	+	Nd	+

(+)=presencia
 (-)=ausencia
 Nd=no determinado

En cambio cuando hay glucosa en el medio la motilidad tipo swimming presento datos diferentes. En la Figura 4.6 se muestran algunos ejemplos del nado en presencia de glucosa, donde el nado presento morfologías diversas. Se observó que todas las cepas analizadas fueron mótils en presencia de glucosa, donde solo la cepa Souza3874 no es mótil bajo ninguna condición (Tabla 4.6).

Tabla 4.7. **Presencia de motilidad tipo swarming en cepas de *E. coli*.**

Cepas	Aeróbico	Anaeróbico
Souza33	+	-
Souza298	+	+
Souza2110	+	+
Souza2382	+	-
Souza3872	+	-
Souza3873	+	+
Souza3874	+	-
Souza3876	+	-
W3110	-	-

(+)=presencia
 (-)=ausencia

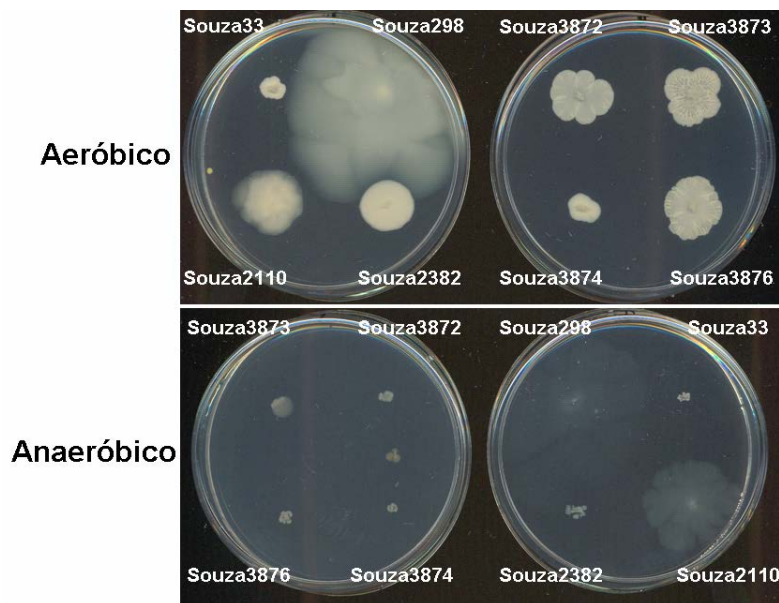


Figura 4.7. **Ensayo de motilidad tipo swarming bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.** Swarming de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 en placas de agar que se incubaron aeróbicamente y anaeróbicamente por 14 h a 30°C.

Cuando se analizó la motilidad tipo swarming se observó un nado parecido al swimming para la cepa Souza298 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Como se muestra en la Figura 4.7 el swarming en condiciones aeróbicas se presentó en todas las cepas, pero en ausencia de oxígeno solo fueron móviles las cepas Souza298, Souza2110 y Souza3873 (Tabla 4.7).

En la Figura 4.8 y Tabla 4.8 se presenta el ensayo de la motilidad tipo twitching de las cepas analizadas, este tipo de motilidad se presentó en todas las cepas en aerobiosis y anaerobiosis, donde solo las cepas Souza33 y Souza3873 no fueron móviles en condiciones de ausencia de oxígeno. Cabe señalar que a las 24h se observó poco movimiento y que a las 72 h se empezó a observar un crecimiento por encima del agar (en aerobiosis), al igual que sobre la caja plástica (en anaerobiosis), lo que sugiere este tipo de motilidad es una translocación en medio sólido donde el patrón es menos coordinado y depende de los pili tipo IV. un ejemplo de esta motilidad.

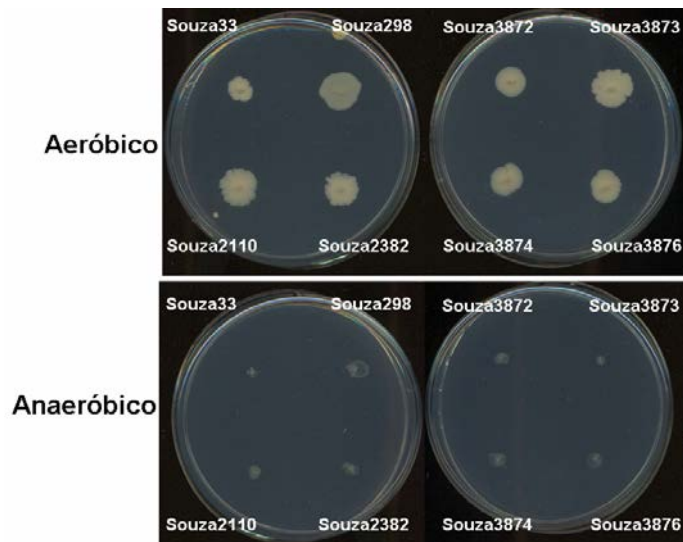


Figura 4.8. **Ensayo de motilidad tipo twitching bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.** Twitching de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 en placas de agar suave que se incubaron aeróbicamente y anaeróbicamente por 24 h a 30°C.

Tabla 4.8. **Presencia de motilidad tipo twitching en cepas de *E. coli*.**

Cepas	Aeróbico	Anaeróbico
Souza33	+	-
Souza298	+	+
Souza2110	+	+
Souza2382	+	+
Souza3872	+	+
Souza3873	+	-
Souza3874	+	+
Souza3876	+	+
W3110	+	+

(+)=presencia

(-)=ausencia

4.8. Expresión de fimbrias y producción de celulosa

La expresión de fimbrias tipo curli o agregativas, así como la producción de celulosa se ha visto involucrada en el establecimiento y mantenimiento del biofilm. Por lo que se analizó la capacidad de las cepas de *E. coli* de crecer en placas de agar con rojo congo. Para el estriado, las cepas se tomaron de cajas de resiembra fresca y se incubaron a 37°C y 30°C tanto en aerobiosis y anaerobiosis.

Mediante este ensayo de detección de la expresión del pili tipo I, en las cepas Souza298, Souza2382, Souza3874, Souza3876 y W3110 no se observó la coloración café. En cambio, para la detección de la producción extracelular de celulosa se detectó que las cepas Souza2110, Souza3872 y MC4110, no excretan este polisacárido ya que las otras cepas analizadas si presenta la coloración rosa que indica la presencia de celulosa en el medio circundante (Figura 4.9 y Tabla 4.9).

Cabe mencionar que bajo condiciones anaeróbicas no se presentan la expresión de fimbria o celulosa, ya que no se observa una coloración definida para las cepas analizadas, lo cual es consistente con reportes anteriores (Colón-González *et al.*, 2004).

Tabla 4.9. Producción de celulosa y expresión de pili en cepas de *E. coli*.

Cepas	Celulosa	Pili tipo 1
Souza33	+	+
Souza298	+	-
Souza2110	-	+
Souza2382	+	-
Souza3872	-	+
Souza3873	+	+
Souza3874	+	-
Souza3876	+	-
W3110	+	-
MC4100	-	+
TOB1	+	+

(+)=presencia

(-)=ausencia

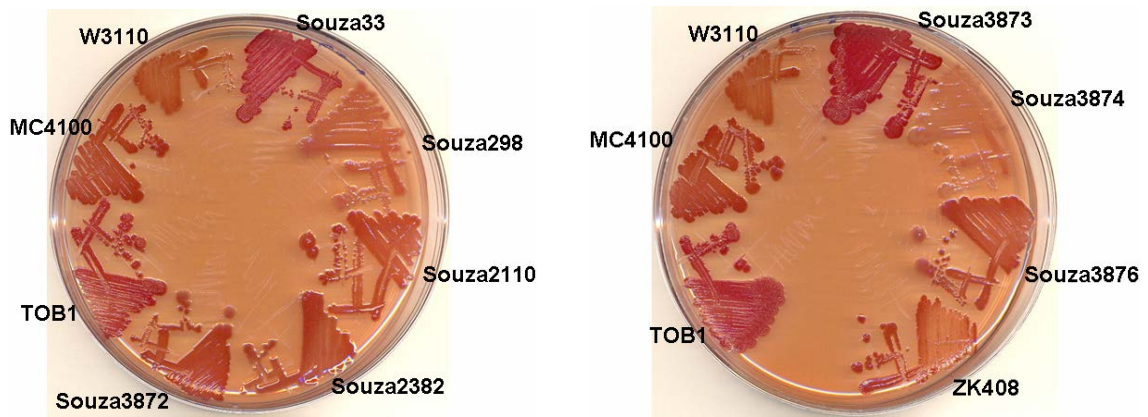


Figura 4.9. **Presencia de pili tipo 1 y producción de celulosa.** Ensayos en cajas de agar con rojo congo incubadas aeróbicamente por 72 h a 30°C.

4.9. Presencia de plásmidos en las cepas aisladas de diversos ambientes

Se logró visualizar el perfil genómico de cepas *E. coli* con la técnica de Eckardth (1978) modificada por Hynes y McGregor (1991). La visualización de los replicones presentes en cepas de *E. coli*, independientemente de su origen, muestran un perfil de bandas de posibles replicones específico para cada cepa.

En la Figura 4.10, se observa que Souza33 contiene cuatro replicones de 2.5 kb, 3.1 kb, 3.5 kb, 4.0 kb, 8.0 kb y 10 kb, la cepa W3110, Souza298 y Souza2110 no contienen replicones, la cepa Souza2382 contiene tres replicones de 1.3 kb, 3.5 kb y 10 kb, la cepa Souza3872 contiene dos replicones de 2 kb y 6 kb, la cepa Souza3873 contiene cuatro replicones de 1.2 kb, 2.2 kb, 3.1 kb y 8 kb, la cepa Souza3874 contiene tres replicones de 0.8 kb, 2.5 kb y 5 kb, la cepa Souza3876 contiene dos replicones de 2 kb y 6 kb.

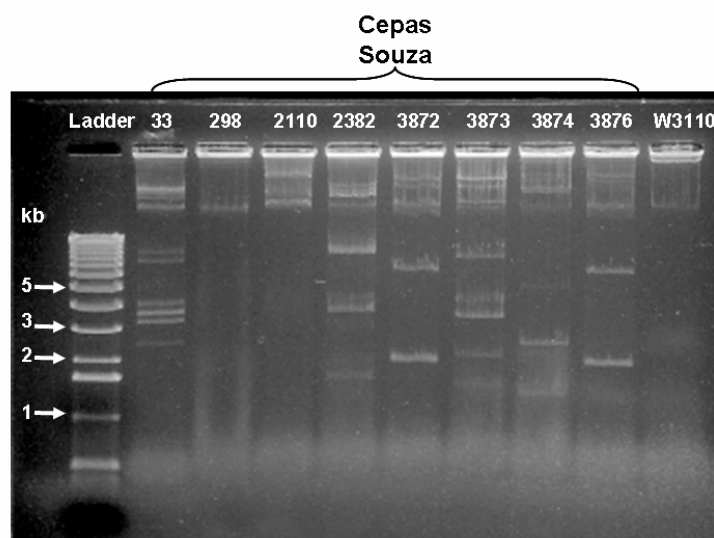


Figura 4.10. **Perfil electroforético de replicones en cepas de *E. coli*.** Gel tipo Eckhardt de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876 y W3110.

Cabe mencionar que las cepas Souza2382 (aislada de Tapir) y Souza3873 (aislada de lodos del Río Remedios) presentan un patrón similar de su perfil de replicones, aunque provienen de distintos lugares. En cambio las cepas Souza3872 y Souza3876 aisladas del lodo del Río Remedios, presentan un patrón similar de perfil de replicones.

También se observa en la Figura 4.10 que los replicones que se encuentran en la parte superior son los genomas, que en algunos casos presentan diferencias en su cantidad. Esto sugiere que el tamaño de los genomas de los diversos aislados son variables en relación a la cepa W3110.

4.10. Efecto de los sobrenadantes en la formación de biofilm

4.10.1. Participación de moléculas extracelulares en la formación del biofilm

La participación de señales moleculares extracelulares juega un papel importante en el proceso de formación de biofilm. Uno de los tipos de señalización molecular entre bacterias es la percepción del quórum. En *P. aeruginosa* los sistemas de respuesta al quórum RhII/R y LasI/R han sido involucrados en la regulación de la estructura del biofilm (Singh *et al.*, 2000; Hentzer *et al.*, 2001; Shih y Huang, 2002).

En *E. coli* se ha reportado que existen señales extracelulares que podrían participar en la respuesta al quórum y en formación de biofilm (Surette y Bassler, 1998; Stickler, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a). Si existiera una molécula inductora de la formación de biofilm que se activara en presencia de oxígeno, entonces aquellas células que fueran incubadas con sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos formarían biofilm incluso en anaerobiosis. Por otro lado, si en condiciones anaeróbicas se produjera o acumulara una molécula inhibitoria de la formación de biofilm, entonces, también inhibiría la formación de biofilm en presencia de oxígeno. Además si en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas se produjera o acumulara una molécula que fuera secretada por otras *E. coli* al medio, entonces podría promover o inhibir la formación de biofilm en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas de células de *E. coli* K-12.

El experimento que se realizó para confirmar estas hipótesis, consistió en mezclar células provenientes de cultivos aeróbicos (24 h) o cultivos anaeróbicos (48 h) con sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos e incubarlos en presencia o ausencia de oxígeno.

Para probar la presencia de factores excretados extracelularmente en LB MOPS usado que afectaran la formación de biofilm de las células de *E. coli* de laboratorio, se utilizaron los sobrenadantes de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876, que fueron seleccionadas por presentar biofilm en LB MOPS con mayor bioma bajo condiciones anaeróbicas.

En la Figura 4.11. se muestra la detección de biofilm por el método de cristal violeta de los cultivos anaeróbicos o aeróbicos de las células de W3110 mezclados con sobrenadantes de Souza298 provenientes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos. Con el cultivo anaeróbico de Souza298 sorprendentemente se formó el biofilm como un anillo alrededor de la interfase (Figura 4.11). Este dato también se presenta como tabla en el artículo anexo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

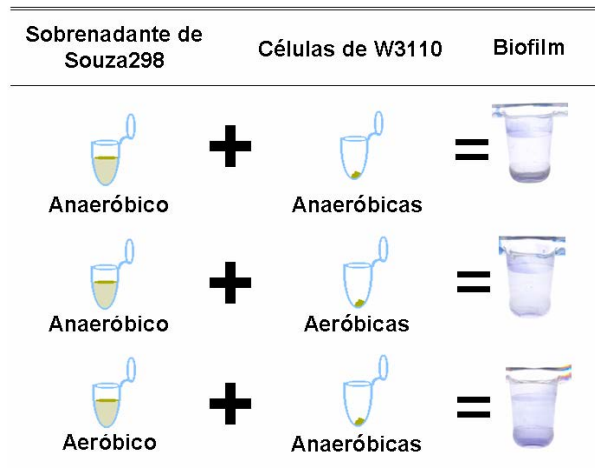


Figura 4.11. **Formación de biofilm en condiciones anaeróbicas de W3110 en presencia del sobrenadante anaeróbico y/o aeróbico de Souza298.** En la parte derecha se muestran los pozos teñidos con cristal violeta después de una incubación por 24 h en condiciones anaeróbicas.

El análisis de la promoción de la formación de biofilm anaeróbico de la cepa W3110 mediado por la presencia de los sobrenadantes de las *E. coli* ambientales demostró que los sobrenadantes provenientes de anaerobiosis y aerobiosis de la cepa Souza3876 también generaron un biofilm en ausencia de oxígeno como un anillo en al interfase aire-liquido de células provenientes de cultivos aeróbicos (Figura 4.12).

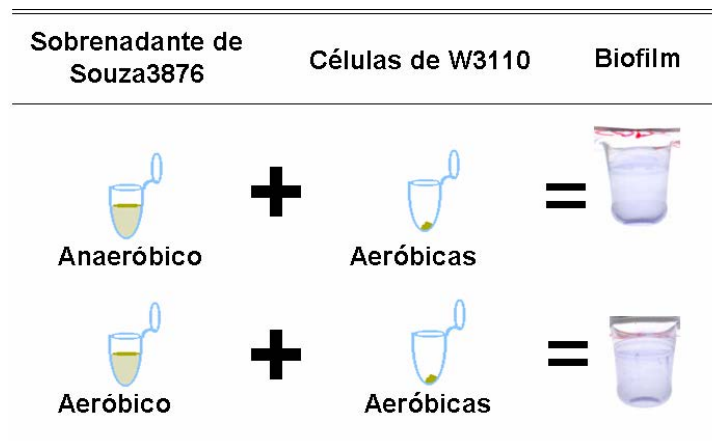


Figura 4.12. **Formación de biofilm en condiciones anaeróbicas de W3110 en presencia del sobrenadante anaeróbico y/o aeróbico de Souza3876.** En la parte derecha se muestran los pozos teñidos con cristal violeta después de una incubación por 24 h en condiciones anaeróbicas.

Cabe mencionar que la incubación anaeróbica de 24 h o 48 h no presentó diferencias en la promoción de biofilm anaeróbico de la cepa W3110.

Para descartar que el medio utilizado LB MOPS pudiera ser el responsable de la promoción de formación de biofilm anaeróbico, se realizaron los mismos experimentos, pero con medio mínimo. El efecto de los SN de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876, en la promoción de formación de biofilm anaeróbico de W3110 mezclado con el SN aeróbico y/o anaeróbico, filtrado o no, o calentado, no promovió la formación de biofilm anaeróbico de la cepa W3110. Lo cual sugiere que el efecto de promoción de formación de biofilm anaeróbico de la cepa W3110 mediado por el sobrenadante de Souza298 o Souza3876 solo se presenta en medio LB MOPS.

También se analizó el efecto del SN de *E. coli* ambientales Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876, en la promoción de la formación de biofilm de la cepa MG1655, donde ningún SN promovió la formación de biofilm anaeróbico de esta cepa de laboratorio. Pero, al analizar la formación de biofilm aeróbico de MG1655 en presencia de los SN de las cepas ambientales, se encontró que las células aeróbicas de MG1655 no forman biofilm aeróbico al mezclarlas con SN (aeróbico y/o anaeróbico) de las cepas Souza2110 y Souza2382, lo que sugiere que en el SN de estas cepas se presenta un factor extracelular que inhibe el establecimiento de biofilm aeróbico de MG1655.

También se analizó el efecto de los SN de *E. coli* ambientales Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876, en la promoción de formación de biofilm en otra cepa de laboratorio MC4100, donde no se promovió la formación de biofilm anaeróbico. La cepa MC4100 en incubación aeróbica no presenta formación de biofilm, pero al incubar cultivos de MC4110 provenientes de una incubación anaeróbica y mezclados con SN (aeróbico y/o anaeróbico) de cepas Souza2382 y Souza3873 se promovió la formación de biofilm aeróbico (promoción), el cual se ve inhibido cuando los SN son hervidos. Lo que indica la presencia de un factor de promoción de biofilm termo sensible. Además, cabe señalar que SN anaeróbico de cepa Souza33 al hervirlo promueve formación de biofilm aeróbico de MC4100 (activación). Lo cual indica la presencia de un factor que se activa con el calor.

También se analizó el posible efecto del SN aeróbico y anaeróbico de W3110 en la formación de biofilm de *E. coli* ambientales Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874, Souza3876. Los datos muestran que el SN anaeróbico (no filtrado y filtrado) de W3110 inhibe la formación de biofilm anaeróbico de la cepa Souza2382 y el SN (filtrado) de W3110 inhibe el biofilm anaeróbico de la cepa Souza2110 (células anaeróbicas). Lo cual indica la presencia de factores secretados por W3110 que afectan el establecimiento de formación de biofilm anaeróbico de *E. coli*.

4.11. Cinética de la producción del factor que promueve la formación de biofilm en anaerobiosis de W3110

El SN aeróbico (24 h) y anaeróbico (48 h) de Souza298 y Souza3876 contienen el ó los factores que promueve la formación de biofilm anaeróbico de W3110 a 30°C. Con la cepa Souza298 que no contiene DNA extracromosomal (Figura 4.10), se decidió determinar el tiempo y mantenimiento de dicho factor mediante una cinética de producción del factor.

A partir de cultivos en LB MOPS de la cepa Souza298 y W3110 incubados a 30°C por cada 2 horas hasta 72 h se obtuvo la curva de producción del factor extracelular que promueve la formación de biofilm anaeróbico de W3110. Los datos están incluidos en la Figura 3, panel B del artículo anexo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

4.12. Naturaleza del factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico de W3110

4.12.1. Efecto del pH de los sobrenadantes en la formación de biofilm

Se ajustó el valor de pH del sobrenadante aeróbico o anaeróbico de Souza298 hasta alcanzar valores de pH de 4, 5, 6, 8, 9 y 10, mediante la adición de NaOH 2.5N y HCl 50%. Con estos sobrenadantes se analizó la promoción de la formación de biofilm en condiciones anaeróbicas de la cepa W3110.

Cuando el sobrenadante anaeróbico de cepa Souza298 se cambió a pH 9 y pH 10 se afectó el crecimiento y formación de biofilm en aerobiosis de las células de W3110. Asimismo, cuando el SN aeróbico de la cepa Souza298 se cambió a pH 4 y pH 5 se afectó el crecimiento y formación de biofilm en aerobiosis de W3110.

Cuando el SN de la cepa Souza298 proveniente de una incubación aeróbica se cambió a pH 8, pH 9 y pH 10, el crecimiento y la promoción del biofilm anaeróbico de W3110 no fue afectado, es decir, se observó la promoción de formación de biofilm en ausencia de oxígeno de W3110. Por otro lado los cambios a pH ácidos de 4, 5 y 6 en los SN provenientes de cultivos aeróbicos y anaeróbicos de Souza298, afectaron el establecimiento de la formación de biofilm en anaerobiosis de W3110. Lo cual indica que el factor que promueve la formación de biofilm en ausencia de oxígeno de W3110 es activo o estable a pH básicos y que a pH ácidos se vuelve inestable.

4.12.2. Efecto de la temperatura, de la proteasa K y de la DNAsa I, en los sobrenadantes

Las moléculas secretadas al medio por las células en cultivo aeróbico o anaeróbico de la cepa Souza298, son las responsables de la promoción de la formación de biofilm de W3110 bajo condiciones de ausencia de oxígeno, para determinar la naturaleza de este factor contenido en los sobrenadantes anaeróbicos de la cepa Souza298, se analizó su posible naturaleza mediante los efectos de la DNAsa I, de la temperatura y la susceptibilidad a la proteninasa K (Figura 4.13).

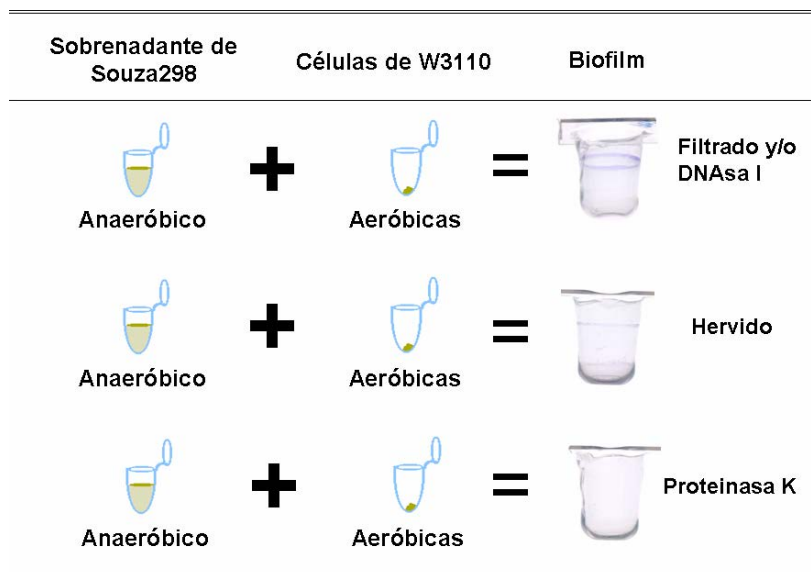


Figura 4.13. **Efecto de la temperatura, de la proteasa K y de la DNAsa I, en los sobrenadantes.** En la parte derecha se muestran los pozos teñidos con cristal violeta después de una incubación por 24 h en condiciones anaeróbicas.

El tratamiento de los sobrenadantes aeróbico y anaeróbico de Souza298 con DNAsa I por 2 h a 37°C e inactivada con EDTA 25 mM y por 10 min a 65°C, no alteró la promoción de la formación de biofilm anaeróbico de W3110 (Figura 4.13). Este dato está incluido en el artículo anexo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

En cambio, cuando el sobrenadante aeróbico y anaeróbico de Souza298 se calentó por 20 min a 100 °C y se mezcló con células provenientes de un cultivo aeróbico o anaeróbico de W3110, la promoción de formación de biofilm anaeróbico de W3110 disminuyó (Figura 4.13). Por otro lado, cuando se incubaron los sobrenadantes aeróbicos y anaeróbicos de la cepa Souza298 con la proteínasa K durante 2 h a 37°C se observó formación de biofilm. Sin embargo, cuando los sobrenadantes fueron hervidos por 20 min, la promoción de la formación de biofilm anaeróbico de W3110 no se observó. Estos datos están incluidos en el artículo anexo (Cabellos-Avelar *et al.*, 2006).

4.12.3. Efecto de extracciones orgánicas en los sobrenadantes

La inhibición del efecto del factor promotor de la formación de biofilm anaeróbico al tratarse con calor y proteínasa K sugiere el obtener mayor información de la naturaleza de este factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico de W3110, se analizó el efecto de extracciones orgánicas del SN de Souza298. Los

datos obtenidos demuestran que con triclorometano o cloroformo (que es buen disolvente de aceites y grasas) se pierde la capacidad de inducción de la formación de biofilm anaeróbico en la W3110 (Figura 4.14).

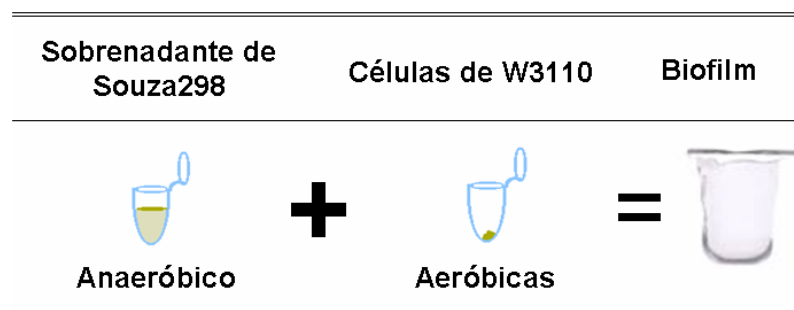


Figura 4.14. Efecto de la extracción orgánica del sobrenadante de la cepa Souza298 en la formación de biofilm anaeróbico de la cepa W3110. En la parte derecha se muestra el pozo teñido con cristal violeta después de una incubación por 24 h en condiciones anaeróbicas.

La extracción con cloroformo elimina la parte lipídica (hidrofóbica) del sobrenadante, por lo cual posiblemente el factor podría tener un elemento lipídico. Estos datos se muestran en el artículo anexo.

Por otro lado se intentó hacer extracciones orgánicas con éter, fenol y acetato de etilo, pero todo indica que el solvente no fue removido en su totalidad del SN por lo que se observó la inhibición del crecimiento de las células.

4.12.4. Visualización del contenido de proteínas en los sobrenadantes

Debido a que posiblemente la naturaleza del factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico de *E. coli* W3110 sea proteíca, se trató de determinar el contenido de proteínas contenidos en los sobrenadantes de Souza298. Para lo cual los sobrenadantes de cultivo anaeróbico de Souza298 se obtuvieron por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos (para eliminar las células). Estos sobrenadantes contienen las proteínas secretadas al medio de cultivo. Para analizar estos sobrenadantes se utilizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes ("SDS-PAGE"), las proteínas presente se detectaron con la tinción por plata. Después de analizar algunos geles no se logró observar alguna diferencia en los patrones de proteínas de los sobrenadantes de las cepas de *E. coli* (Figura 4.15 y 4.16).

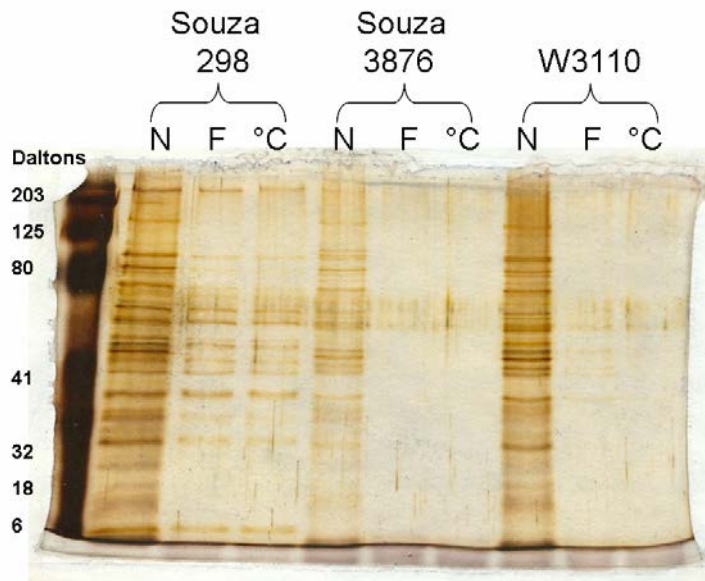


Figura 4.15. **Detección de proteínas en los sobrenadantes provenientes de cultivo aeróbicos de las cepas Souza298, Souza3876 y W3110.** Geles de acrilamida teñidos por plata. N, sobrenadante no filtrado; F, sobrenadante filtrado; °C, sobrenadante hervido.

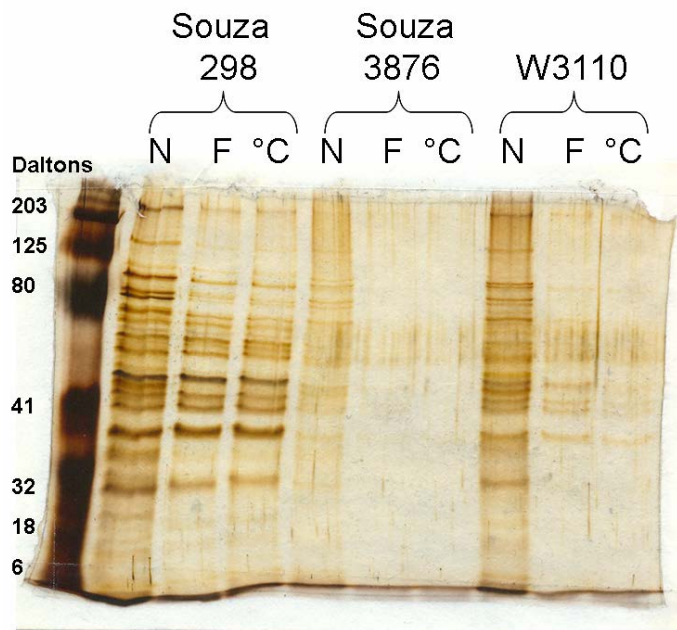


Figura 4.16. **Detección de proteínas en los sobrenadantes provenientes de cultivo anaeróbicos de las cepas Souza298, Souza3876 y W3110.** Geles de acrilamida teñidos por plata. N, sobrenadante no filtrado; F, sobrenadante filtrado; °C, sobrenadante hervido.

4.13. Expresión de fimbria mediante el ensayo de aglutinación

Pratt y Kolter (1998) reportaron que el pili tipo 1 y el flagelo contribuyen a la formación de biofilm en *E. coli* K-12. Para evaluar la presencia de fimbria tipo 1 en los aislados ambientales de *E. coli* y en la formación de biofilm anaeróbico, se examinó la capacidad de la unión de las células de W3110 a la manosa de superficie de *Sacharomyces cerevisiae* en presencia y ausencia del SN de la cepa Souza298. Ninguno de los tratamientos afecta esta interacción, por lo cual la fimbria tipo 1 no es determinante en la promoción de formación de biofilm (Ver Figura 4, del artículo anexo, Cabellos-Avelar *et al.*, 2006)

4.14. Microscopia electrónica de transmisión

La adhesión a superficies es determinante en el establecimiento del biofilm, en el cual están involucradas diferentes estructuras celulares como flagelo, pilis o diversos tipos de fimbrias, así como proteínas de adhesión. Debido a la presencia de un factor que promueve la formación de biofilm anaeróbico de la cepa W3110 de *E. coli* en el sobrenadante proveniente de condiciones anaeróbicas de un cultivo de la cepa Souza298 se determinó el posible efecto en la morfología de las células de W3110 al ser incubadas con el SN de Souza298. Para lo cual se hizo una microscopia electrónica de transmisión de acuerdo a 2. 5. 9 de material y métodos.

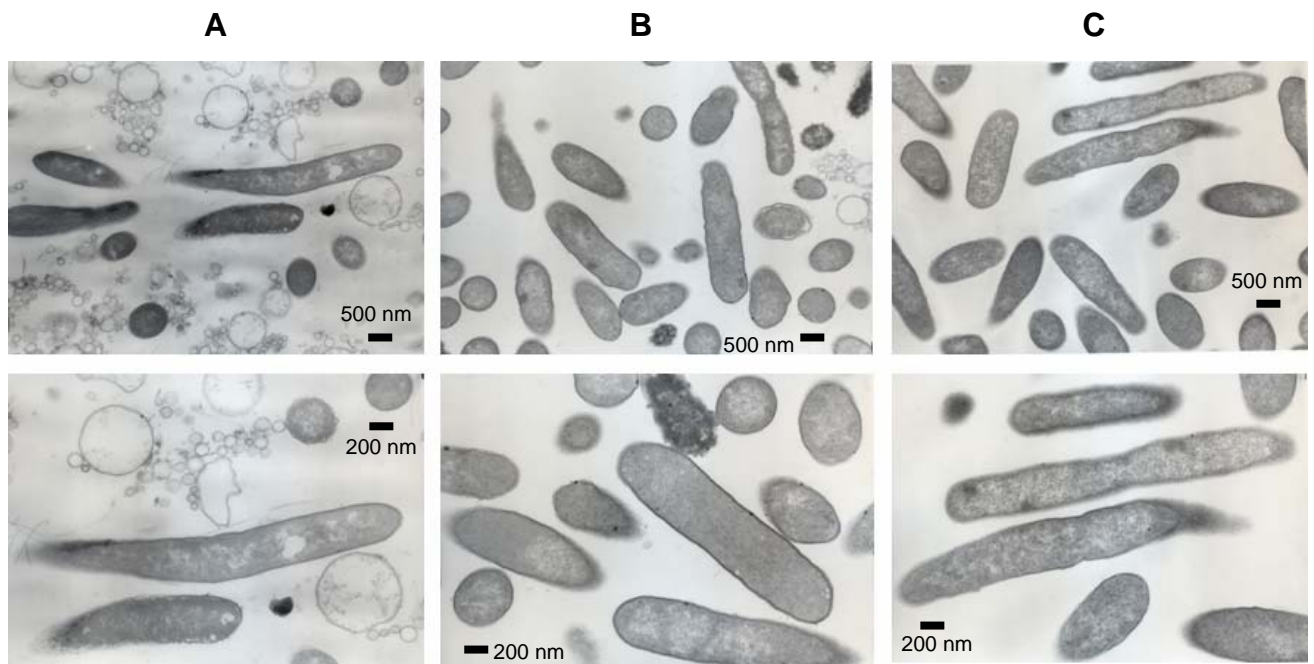


Figura 4.17. **Micrográficas electrónicas de transmisión.** A) Células de W3110 incubadas con LB MOPS por 48 h a 30°C en anaerobiosis. B) Células de W3110 incubadas con el sobrenadante de células de W3110 por 48 h a 30°C en anaerobiosis. C) Células de W3110 incubadas con el sobrenadante de células de Souza298 por 48 h a 30°C en anaerobiosis. Todos los cultivos fueron en LB MOPS incubados en ausencia de oxígeno por 48 h a 30°C.

En la Figura 4.25. se muestra las micrográficas de células de W3110 tratadas con LB, el SN de Souza298 y su propio SN, en las cuales no se puede observar alguna diferencia en la envoltura celular, debido al procesamiento de las muestras. Por lo cual se sugiere otro tratamiento donde se pueda visualizar apéndices celulares, como flagelo o pilis.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

“ANÁLISIS DE UN BANCO DE MUTANTES”.

La importancia del estudio de los biofilms radica en impacto tanto negativo como positivo que tiene en áreas como la medicina, la industria y el medio ambiente (Lazazzera *et al.*, 2005; Stanley y Lazazzera, 2004.; Watnick y Kolter, 2000). El proceso de formación de biofilm comienza con la adhesión de células bacterianas a superficies abióticas o bióticas, seguido por la formación de microcolonias, la maduración del biofilm y finalmente su disgregación (O'Toole *et al.*, 2000; Stanley y Lazazzera, 2004; Watnick y Kolter, 2000). Este proceso de formación de biofilms se ve afectado por diversos factores principalmente los ambientales (Stanley y Lazazzera, 2004) y por los determinantes genéticos de cada especie que forme parte de la comunidad (Davey y O`Toole, 2000).

Por medio de la caracterización de mutantes afectadas en su capacidad de establecer biocapas bacterianas, se han encontrado diversos factores genéticos involucrados en el desarrollo, estructura, morfología y fisiología de los biofilms (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002; Genevaux *et al.*, 1999). Algunos de los genes identificados mediante este tipo de estudios se muestran en la Tabla 1.1. Con ello se han identificado algunas proteínas y estructuras celulares que participan en el establecimiento del biofilm, aunque en algunas etapas del proceso de formación de biofilm como la disgregación, aún falta por descifrar algunos de los factores involucrados en el metabolismo del mantenimiento del biofilm.

De acuerdo con la cinética de formación de biofilm de *E. coli* W3110 existe un máximo de producción de biofilm a las 24 h de cultivo aeróbico y que a partir de este tiempo se inicia la disgregación (Colón-González, *et al.*, 2004). En cambio en la cinética de formación de biofilm en condiciones aeróbicas de *E. coli* MG1655 existe un máximo de producción de biofilm a las 32 h y que a partir de este tiempo se presenta una disminución del biofilm que se incrementa a partir de las 54 h (Figura 3.3). A partir de esta observación y por medio de la selección de cepas mutadas por la inserción de un transposón contenidas en un banco de mutantes, se logró aislar dos mutantes capaces de presentar un biofilm con mayor biomasa que la cepa parental a las 52 h (Figura 3.1). Estas mutantes presentaron un crecimiento similar a su cepa parental (Figura 3.2) lo cual sugiere que el gen afectado por la inserción del

transposón es responsable del fenotipo de mayor biomasa en biofilm a las 52 h. Estas dos mutantes se denominaron mutante No. 12 (JMH1814) y mutante No. 17 (JMH1817). En las cinéticas de formación de biofilm se observó en la mutante No. 12 dos probables máximos de producción de biofilm (Figura 3.4). En cambio en la cinética de formación de biofilm la mutante No. 17 se presentó una menor biomasa y un solo máximo de producción de biofilm a las 48 h. Cabe señalar que la mutante No. 12 presentó mayor biomasa y que el patrón de su cinética de formación de biofilm es similar a la de la cepa W3110 como lo describió Colón-González *et al.*, (2004).

En muchos estudios se ha visto que la motilidad mediada por flagelo está involucrada en el establecimiento del biofilm. Nuestros datos sobre la motilidad nos indican que ambas mutantes se desplazan más eficientemente que su cepa parental (Figura 3.7). La mutante No. 12 presentó mayor motilidad en ausencia de oxígeno lo cual podría indicar que el oxígeno participe en la regulación de la expresión del flagelo directamente o indirectamente.

También mediante estructuras de superficie como pilis o producción de adhesinas o exopolímeros se mantienen un biofilm, por lo que la presencia en las mutantes de apéndices celulares que funcionan como adhesinas, juegan un papel importante. Nuestros resultados indican que las mutantes No.12 y No. 17 no expresan el pili tipo I el cual está involucrado en la adhesión (Figura 3.8), pero de acuerdo al ensayo de crecimiento en rojo Congo (Figura 3.8) la producción de celulosa está presente. Tal vez, esto nos indica que la celulosa estaría ayudando a mantener la mayor formación de biofilm a las 52 h.

Por otro lado, la confirmación de que el fenotipo de formación de a las 52 h es debido a la inserción del transposón, ya que transductantes a partir de lisados de las cepas mutantes No. 12 y No. 17 confirmó que el gen afectado es el responsable del fenotipo aislado (Figura 3.9). Por otro lado se logró clonar el fragmento donde ocurrió la inserción de la mutante No. 12 en el plásmido pSK+(1), pero la identidad del gen interrumpido aun se desconoce.

Hasta este punto, todos los resultados sugieren que las dos mutantes mantienen un biofilm hasta 52 horas, que la motilidad y la expresión de pili tipo 1 y producción de celulosa no determinantes involucrados en este fenotipo. Y que el conocer que gen se el afectado por la inserción del transposon y responsable del

fenotipo es de gran importancia para dilucidar un nuevo mecanismo en el establecimiento del biofilm así como su mantenimiento.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

“ANÁLISIS DE CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE DIFERENTES AMBIENTES”

Estudiamos la formación de biofilm en *E. coli* debido a que esta bacteria es el más estudiada (Blattner *et al.*, 1997) y el genoma de algunas cepas ha sido secuenciado (Welch *et al.*, 2002), hay microarreglos disponibles (Selinger *et al.*, 2000) y se conocen las funciones de muchas de sus proteínas. Por lo tanto los resultados obtenidos en este estudio ayudan a entender como se establecen el biofilm en condiciones anaeróbicas y algunos de los posibles genes involucrados en el mantenimiento del biofilm en presencia de oxígeno.

Las diversas *E. coli* K-12 utilizadas en los laboratorios de investigación como W3110, MG1655, MC4100 y otras utilizadas en biología molecular perdieron la capacidad de formar biofilm en ausencia de oxígeno. Tal vez esto se deba a la domesticación por los años de uso, a las resiembras y de un constante estrés a que han sido sometidas. Por lo cual son incapaces de establecer un biofilm en ausencia de oxígeno aún cuando *E. coli* es un organismo facultativo que puede crecer en anaerobiosis utilizando aceptores alternos al oxígeno. Esto posiblemente se deba a un silenciamiento en la maquinaria necesaria para establecer el biofilm, mediante una respuesta genética a nivel regulación o simplemente que estas cepas, sufrieron cambios en la expresión de genes, mediante represión o por mutaciones de genes como los que codifican para factores sigma (Jishage *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 2001; Verma y Egan, 1985) o inclusive eventos de delección de genes. Esto se ha demostrado en aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística los cuales muestran diferentes habilidades en la formación de biofilm a comparación de las cepas utilizadas en laboratorio.

Teniendo en cuenta que en ausencia de oxígeno diferentes cepas de laboratorio de *E. coli* K-12 no son capaces de formar biofilm. Se analizó la posibilidad de que alguna cepa de *E. coli* aislada del ambiente pudiera establecer un biofilm en condiciones anaeróbicas.

La mayor diferencia de la capacidad de formación de biofilm de las 77 cepas *E. coli* bajo condiciones aeróbicas es que para establecer un biofilm prefieren en orden decreciente los medios M1>M2>M4>M3>M5. Hay cepas como Souza2274, Souza3517, Souza3640, Souza3642, Souza5026 que sólo forman biofilm en LB o

cepas como Souza45 que sólo forma biofilm en LB MOPS con nitrato de sodio o la cepas Souza161 y Souza5027 que solo forma biofilm en medio mínimo. Hay cepas como Souza3639, Souza3643 y Souza5069 identificadas como UTI y cepas aisladas del lodo del Gran Canal y del río Remedios que no forman biofilm en ningún medio (Tabla 4.1 y 4.2). En cambio la capacidad de formación de biofilm de las 77 cepas *E. coli* bajo condiciones anaeróbicas, es que para establecer un biofilm prefieren en orden decreciente los medios M2>M3>M1>M4>M5. Al parecer la presencia en el medio LB MOPS de nitrato de sodio y glucosa, promovió la formación de biofilm en ausencia de oxígeno en 30 y 28 cepas de *E. coli* respectivamente. Esto posiblemente se debe a que el nitrato es aceptor alternativo de electrones. Cabe mencionar que las cepas Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876, aisladas de murciélago, ratón, de humano (tipificada como ECOR), de tapir y de lodos del río Remedios (últimas tres cepas), establecieron un biofilm en anaerobiosis en los cinco medios utilizados.

La habilidad de formación de biofilm parece variar de acuerdo a la cepa y a las condiciones ambientales y nutricionales. Por ejemplo se ha visto que cuando se utiliza citrato como fuente de carbono el biofilm de *P. aeruginosa* es diferente en arquitectura y no requiere del flagelo pero sí del pili tipo IV que cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono (Klausen *et al.*, 2003), lo cual sugiere que al utilizar los diferentes medios se observan cambios en la formación de biofilm. También se ha observado que al complementar el medio BM con glucosa, sacarosa, galactosa o manitol se observó que la formación de biofilm se incrementó cuando está presente la sacarosa (Brown *et al.*, 2005.), lo cual indicaría que utilizar otras fuentes de carbono podría dar resultados diversos en la promoción o inhibición de la formación de biofilm. Esto se demostró en *E. coli* ya que es capaz de adherirse a las superficies como los pozos de microtitulación y vidrio para establecer un biofilm en ausencia de oxígeno en los diferentes medios utilizados. Tal vez esta capacidad se deba a que estas *E. coli* del ambiente responden o tienen otros mecanismos de formación de biofilm con nuevas moléculas de señalización o estructuras celulares que le permitan establecerse como comunidad adherida a una superficie. Además las células de *E. coli* presentan diferentes habilidades de adhesión a superficies tal vez por el crecimiento en diferentes medios por efecto de los nutrientes en la regulación de expresión de estructuras de superficie celular o propiedades de la superficie celular como por ejemplo en la mutante de *E. coli* K-12 MG1655 en *cysB* que altera el

crecimiento en un 30% en LB y un 0.2% en LB con glucosa, pero en medio mínimo no se ve este efecto. También se ha visto que la presencia de glucosa inhibe la represión de la dispersión de biofilm en mutantes CsrA (Jackson *et al.*, 2002b) y hay diferencias en la formación de biofilm de *P. aeruginosa* y las mutantes en quórum sensing en *las* y *rhl* cuando se utiliza diferentes fuentes de carbono como glucosa o citrato (Kievit *et al.*, 2001)

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento de las cepas ambientales son más rápidas y presentan un mejor crecimiento que W3110, aunque Souza298 presenta un crecimiento similar a la de laboratorio por lo cual el efecto de los diferentes medios utilizados para la formación de biofilm, como ya se menciona, está en la composición del medio y no en la velocidad del crecimiento o alcance de la densidad celular.

Estudios sobre las cinéticas de formación de biofilm por el método de O'Toole *et al.* (1999) y modificado por Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, (2000), encontraron que existe un máximo de producción de biofilm a las 24 horas de cultivo aeróbico y que a partir de este tiempo inicia la disgregación de biofilm (Colón-González *et al.*, 2004). En condiciones anaeróbicas las cinéticas de formación de biofilm de Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 se observa en todo el pozo o como un anillo alrededor de la interfase aire-líquido, encontrando patrones diferentes en los tiempos de máxima producción de biofilm así como en su disgregación y mantenimiento a lo largo de las cinéticas. La formación de biofilm se ha visto como el anillo y como adherida toda la superficie del pozo (Ren *et al.*, 2005). También en diversos estudios sobre cinéticas de formación de biofilm se ha observado diferencias en los tiempos de establecimiento del biofilm, así como su arquitectura y su disgregación.

Una de las vías alternativas por el cual el mecanismo de la formación de biofilm ocurra depende de las condiciones ambientales y del efecto que tiene en la expresión de proteínas extracelulares.

En *E. coli* la expresión del pili conjugativo acelera la adhesión inicial y el desarrollo del biofilm y obvia el requerimiento de flagelo, pili tipo I, curli y Ag43 (Ghigo, 2001; Reisner *et al.*, 2003). En *E. coli* (EAEC) para establecer el biofilm en altas concentraciones de glucosa y osmolaridad, se requiere a la fimbria agregativa (AAF/II), pero no del pili tipo I, Ag43 o la motilidad (Sheik *et al.*, 2001). Existen otros tipos de pilis como el tipo IV de *P. aeruginosa* que media la adhesión inicial y el

twitching y son diferencialmente requeridos para la formación de biofilm bajo diferentes condiciones ambientales (O'Toole y Kolter, 1998). En el control de la maduración del biofilm en *B. cepacia* por el sistema de quórum sensing *cepI/cepR* encontraron que el swarming *per se* no es esencial para la formación de biofilm en superficies abióticas (Huber *et al.*, 2001). En aislados ambientales de *Pseudomonas* se ha observado la formación de biofilm pero sin la capacidad de hacer twitching (Head y Yu, 2004). En el presente trabajo, la examinación de las capacidades de tres tipos de motilidad en las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873, Souza3874 y Souza3876 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas mediante el ensayo de swimming, swarming y twitching, mostraron diferencias en cada cepa. Como en el caso de las cepas Souza3874 que no es motil bajo ninguna condición. Donde solo las cepas Souza298, Souza2110 y Souza3873 presentaron swarming en ausencia de oxígeno. En el caso del twitching donde la mayoría presento menos las cepas Souza33 y Souza3873.

Estudios recientes han demostrado que aislados ambientales de *E. coli* (Anderson *et al.*, 2004; Bokranz *et al.*, 2005; Castonguay *et al.*, 2005; Serres *et al.*, 2001; Sheikh *et al.*, 2001) tienen la habilidad de reconocer y adherirse a superficies específicas mediante fimbrias, proteínas como la Ag43, producción de curlis, producción de ácido colánico y la producción de adhesinas tipo polisacáridos (Stanley y Lazazzera, 2004) y que esta capacidad de formar biofilm esta influenciada por diversas condiciones de crecimiento como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el oxígeno y cuando esta en asociación con otras especies bacterianas formando un biofilm mixto (Castonguay *et al.*, 2005; Serres *et al.*, 2001). Se ha visto que aislados ambientales son capaces de adherirse a vidrio formando mas biofilm a 28°C debido a que se expresan los curlis (Castonguay, *et al.*, 2005).

El fenotipo de formación de biofilm en la interfase aire-liquido y el morfotipo de las colonias tipo rdar es debido al presencia de fibras de celulosa y curli/Tafi fimbria. En *Salmonella enterica* las fimbrias Tafi se presentan cuando hay celulosa como fibras enmarañadas y cuando no hay celulosa son pequeñas estructuras lineales (Solano *et al.*, 2002; Zogaj *et al.*, 2001). Además en los biofilms de *E. coli* y *S. enterica* se presentan otros componentes, como los extra polisacáridos, los cuales requieren celulosa para formar parte de la matriz (White *et al.*, 2003). En el caso de las cepas Souza33, Souza298, Souza2110, Souza2382, Souza3872, Souza3873,

Souza3874 y Souza3876 la expresión de fimbria y producción de celulosa no son determinantes para el establecimiento del biofilm anaeróbico.

Notablemente, la presencia de biofilm aeróbico y/o anaeróbico, no correlaciona con las expresión de fimbria y producción de celulosa, ni las diferentes capacidades de motilidad analizadas, Nuestros datos sugieren que *E. coli* ambientales no requieren de fimbria tipo 1, flagelo, curli, pili tipo 1, pili tipo IV, ya que pueden establecerse o no en biofilm anaeróbico o aeróbico. Por lo que no se descarta la posibilidad de que en el genoma puede haber más genes tipo fimbrias o como proteínas de adhesión, debido a la presencia de DNA extracelular como en la Figura 4.10.

El quórum sensing en las bacterias ha jugado un papel importante en la expresión de genes involucrados en el desarrollo del biofilm. En *E. coli* el sistema de quórum sensing mediado por el autoinductor AI-2 regula la expresión de factores de virulencia, sistema de excreción tipo III, quimiotaxis, la síntesis de flagelo, la motilidad y la agregación celular (Sperandio *et al.*, 1999; Sperandio *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2002). Hay evidencias que sugieren la existencia de señales del quórum sensing adicionales a AI-2 en *E. coli*, como un factor extracelular producido en la fase estacionaria que activa los genes *cysK*, *astD*, *tnaB* y *gabT* presente en LB y estable a pH 12 y a 100°C (Baca-DeLancey *et al.*, 1999). También en *E. coli* O157:H7 se encontró un nuevo autoinductor denominado AI-3 involucrado en las interacciones con células eucarióticas (Sperandio *et al.*, 2003). Con nuestros datos parece ser que bajo nuestras condiciones experimentales, la promoción de la formación de biofilm anaeróbico de *E. coli* W3110 involucra la participación de moléculas extracelulares, ya que sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos y anaeróbicos de la cepa Souza298 tuvieron efecto en la formación de biofilm de células provenientes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos que fueron incubados en ausencia de oxígeno (Figura 3.9). Nuestros datos nos permiten proponer que *E. coli* W3110 no sintetiza una molécula señal que le permitiría hacer biofilm en condiciones anaeróbicas, pero tiene toda la maquinaria necesaria para responder a la molécula secretada por las cepas ambientales de *E. coli*.

Recientemente Valle y colaboradores reportaron que el biofilm de diversas especies se ve inhibido por el sobrenadante de *E. coli* CFT073, el cual contiene polisacáridos capsulares tipo II que inducen cambios fisicoquímicos alterando la superficie de las células así como su adhesión a superficies (Valle *et al.*, 2006). En el

presente trabajo, el sobrenadante de la cepa Souza2110 presento un efecto similar al inhibir la formación de biofilm aeróbico de *E. coli* W3110. También el sobrenadante de las cepas Souza2382 y Souza3873 promovieron la formación de biofilm de *E. coli* MC4100 la cual no formaba biofilm.

El análisis de la naturaleza del factor nos indico que posiblemente sea una proteína con un componente lipídico. La participación de lipoproteínas se ha visto involucrada en el establecimiento del biofilm en condiciones de ausencia de oxígeno de *E. coli*, y se requiere la adhesión o unión de la envoltura celular con la superficie hidrofóbica (pozos de PVC). Otto y Silhavy, (2002) reportaron que bajo condiciones aeróbicas, el sistema de dos componentes CpxRA, que participa en la traducción de señales asociado con la lipoproteína NlpE localizada en la membrana externa de *E. coli*, regulan y promocionan la adhesión de las células, aun sin la presencia de otros organelos de superficie celular, como los curlis o fimbrias tipo 1 (Otto y Silhavy, 2002). Aunque estos datos indican la presencia de otras proteínas involucradas en la adhesión, no se descarta la posibilidad de que alguna lipoproteína que fuera secretada al medio promoviera la formación de biofilm en ausencia de oxígeno *E. coli*.

Tal vez, los potenciales de esta lipoproteína de membrana incluyen el transporte de moléculas de señalización o de productos metabólicos. Alternativamente esta proteína es necesaria para la adaptación a condiciones particulares en el biofilm como el establecimiento en anaerobiosis que puede servir como adhesina como otra estructura de la superficie de la célula.

Dentro de las lipoproteínas que se conocen se encuentran las lipocalinas que se localizan en el espacio periplasmático y en la membrana interna e externa. La expresión de las lipocalinas esta regulada por el factor sigma σ^S y para su maduración sufren una adición de un péptido señal. También las lipocalinas son secretadas al medio por sufrir un corte proteolítico en la región N-terminal. En *E. coli* se conoce la lipocalina Blc que se expresa bajo ciertas condiciones de estrés. Además de la relación de Blc con la resistencia a antibióticos y con la activación del sistema inmune (Bishop, 2000) a las lipocalinas no se les relaciona con otras funciones dentro de la célula, sin embargo no se descarta la posibilidad de que este tipo de lipoproteína este involucrada en la promoción de la formación de biofilm anaeróbico en *E. coli* W3110.

Después de un analizar la posible naturaleza proteínica del factor que promueve la formación de biofilm debido a su estabilidad en al calor y su sensibilidad a la proteinasa K, así como un componente lipídico no se puede descartar la posibilidad de que la señal de promoción formación del biofilm sea del tipo quórum sensing como se mencionó anteriormente.

Los microorganismos viven en las superficies formando comunidades llamadas biofilms, la estructura precisa, la química y fisiología varía de acuerdo al ambiente local. En este estudio las cepas ambientales de *E. coli* tienen la capacidad de formar biofilm en condiciones anaeróbicas. Las condiciones anaeróbicas alteran la cinética de formación de biofilm de las cepas ambientales y la motilidad y adhesión que se sabe están involucrados en el proceso de formación de biofilm son expresados diferencialmente en las cepas ambientarles en ausencia o presencia de oxígeno no son determinantes para el establecimiento del biofilm.

Por otro lado el sobrenadante aeróbico y anaeróbico de la cepa Souza298 contiene un (os) factor (es) que promueven que células de W3110 provenientes de cultivos aeróbico y anaeróbicos formen biofilm en condiciones de ausencia de oxígeno. El sobrenadante anaeróbico de la cepa Souza298 contiene un factor que posiblemente sea de naturaleza proteínica con un complemento lipídico.

Por eso la identificación de los factores ambientales, genéticos y de las moléculas participantes en la comunicación celular “quórum sensing”, nos permitirá conocer los mecanismos moleculares involucrados en la formación del biofilm y por ende prevenir, controlar y manipular las etapas de desarrollo del biofilm y de esta manera comprender su comportamiento en la naturaleza.

Estos resultados nos permite proponer una hipótesis sobre como ocurre la formación de biofilm en ausencia de oxígeno. **El oxígeno es parte de la matriz del biofilm y posiblemente juegue un papel en la regulación de genes involucrados en la adhesión y mantenimiento del biofilm.** Por otro lado, la presencia de esta posible lipoproteína, podría inducir a las células la expresión de alguna estructura de la envoltura celular, o alterar la respuesta al ambiente exterior, o alterar el microambiente y generar que se propicie la adhesión en ausencia de oxígeno.

Bajo nuestras condiciones experimentales resulta interesante que solo a 30°C se observe este fenotipo. Las bases del proceso se desconocen. Pero una posible explicación sería que actué a nivel intracelular o extracelular como una adhesina con diferentes afinidades por plástico y vidrio, capaz de mediar la autoagregación

por medio de un reconocimiento intercelular y capaz de unirse a otra estructura o proteína de superficie y mediar la autoagregación y es la posiblemente la responsable de la promoción formación de biofilm anaeróbico.

Por otro lado las moléculas difusibles como las Acyl-HSLs son hidrofóbicas de acuerdo a lo largo de su cadena pueden formar parte del ambiente hidrofóbico de la membrana celular (Parsek y Greenberg, 2005) por lo que no se puede descartar que sea parte de la matriz y la molécula hidrofóbica que se secreta (contenida en el sobrenadante de Souza298) se difunde y forma parte de la matriz y promueve la formación de biofilm anaeróbico. Tal vez analizando los perfiles de producción de AHL o A-12 de Souza298, se podría pobrar dicha hipótesis.

7. REFERENCIAS

1. Adams, J. L., and R. J. C. McLean. 1999. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4258-4287.
2. Ahmer, B. M. 2004. Cell-to-cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 52: 933-945.
3. Allison, D. G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe, and P. Gilbert. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 179-184.
4. Anderson, G. G., S. M. Martin, and S. J. Hultgren. 2004. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microb. Infec.* 6: 1094-1101.
5. Angert, E. R., D. E. Northup, A-L. Reysenbach, A. S. Peek, B. M. Goebel, and N. R. Pace. 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist.* 83: 1583-1592.
6. Arp, G., A. Reimer, and J. Reitner. 2001. Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in Phanerozoic oceans. *Science.* 2001. 292: 1701-1704.
7. Austin, J. W., G. Sanders, W. W. Kay, and S. K. Collinson. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 295-301.
8. Baca-DeLancey, R. R., M. M. T. South, X. Ding, and P. N. Rather. 1999. *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 4610-4614.
9. Balzer, G. L., and R. J. C. McLean. 2002. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Can. J. Microbiol.* 48: 675-680.
10. Barrios, A. F. G., R. Zuo, D. Ren, and T. K. Word. 2005. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotech. Bioen.* 93: 188-200.
11. Banin, E., M. L. Vasil, and P. Greenberg. 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 11076-11081.

-
12. Banning, N., S. Toze, and B. J. Mee. 2003. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiol.* 149: 47-55.
 13. Bassler, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 582-587.
 14. Beenken, K. E., P. M. Dunman, F. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, J. S. Blevins, and M. S. Smeltzer. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* 186: 4665-4684.
 15. Beloin, C., K. Michaelis, K. Linder, P. Landini, J. Hacker, J.-M. Ghigo, and U. Dobrindt. 2006. The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 1316-1331.
 16. Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. J. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille, and J.-M. Ghigo. 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51: 659-674.
 17. Bishop, R. E. 2000. The bacterial lipocalins. *Bioch. Bioph. Ac.* 1482: 73-83.
 18. Biswas, S. K., and W. L. Chaffin. 2005. Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Cur. Microbiol.* 51: 100-104.
 19. Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. Davis, W. H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277: 1453-1474.
 20. Bokranz, W., X. Wang, H. Tschape, and U. Romling. 2005. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 54: 1171-1182.
 21. Boles, B. R., M. Thoendel, and P. K. Singh. 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57: 1210-1223.
 22. Bomchil, N., P. Watnick, and R. Kolter. 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 185: 1384-1390.

-
23. Borriello, G., E. Werner, F. Roe, A. M. Kim, G. D. Ehrlich, and P. S. Stewart. 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. 48: 2659-2664.
 24. Boyd, A., and A. M. Chakrabarty. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2355-2359.
 25. Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman, and R. Kolter. 2005. Biofilms: the matrix revisited. TRENDS in Microbiology. 13: 20-26.
 26. Brombacher, E., C. Dorel, A. J. B. Zehnder, and P. Landini. 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. Microbiol. 149: 2874-2857.
 27. Brown, T. A., Jr. S. –J. Ahn, R. N. Frank, Y.-Y. M. Chen, J. A. Lemos, and R. A. Burne. 2005. A hypothetical protein of *Streptococcus mutans* is critical for biofilm formation. Infect. Immun. 73: 3147-3151.
 28. Cabellos-Avelar, T., V. Souza, and J. Membrillo-Hernández. 2006. Spent media from cultures of environmental isolates of *Escherichia coli* can suppress the deficiency of biofilm formation under anoxic conditions of laboratory *E. coli* strains. FEMS Microbiol. Ecol. 58: 414-424.
 29. Carlén, A., S. G. Rüdiger, I. Loggner, and J. Olsson. 2003. Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite *in vitro* and on teeth *in vivo*. Oral Microbiol. Immun. 18: 203-207.
 30. Castonguay, M-H., S. van der Schaaf, W. Koester, J. Krooneman, W. van der Meer, and P. Landini. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. Res. Microbiol. 157: 471-478.
 31. Colón-González, M., M. M. Méndez-Ortiz, and J. Membrillo-Hernández. 2004. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. Res. Microbiol. 155: 514-521.
 32. Collet, A., S. Vilain, P. Cosette, G. A. Junter, T. Jouenne, R. S. Phillips, and P. Di Martino. 2007. Protein expression in *Escherichia coli* S17-1 biofilms: impact of indole. Antonie van Leeuwenhoek. 91: 71–85.

-
33. Corona-Izquierdo, F. P. and J. Membrillo-Hernández. 2002a. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 105-110.
 34. Corona-Izquierdo, F. P. and J. Membrillo-Hernández. 2002b. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Res. Microbiol.* 153: 181-185.
 35. Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. 284: 1318-1322.
 36. Czekulin, J. R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro- Garcia, and J. P. Nataro. 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65: 4135-4145.
 37. Danese, P. N., L. A. Pratt, S. L. Dove, and R. Kolter. 2000. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 37: 424-432.
 38. Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter. 2000b. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182: 3593-3596.
 39. Davey, M. E., and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
 40. Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science.* 280: 295-298.
 41. De Lisa, M. P., C. F. Wu, L. Wang, J. J. Valdes, and W. E. Bentley. 2001. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 5239-5247.
 42. De los Ríos, A., J. Wierzbos, L. G. Sancho and C. Ascaso. 2003. Acid microenvironments in microbial biofilms of antarctic endolithic microecosystems. *Environ. Microbiol.* 5: 231–237.
 43. Di Martino, P., A. Merieau, R. Phillips, N. Orange, and C. Hulen. 2002. Isolation of an *Escherichia coli* strain mutant unable to form biofilm on polystyrene and to adhere to human pneumocyte cells: involvement of tryptophanase. *Can. J. Microbiol.* 48: 132-137.

-
44. Doggett, M. S. 2000. Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1249-1251.
 45. Dorel, C., P. Lejeune, A. Rodrigue. 2006. The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res. Microbiol.* 157: 306-314.
 46. Dougan, G., A. Haque, D. Pickard, G. Frankel, P. O'Goara, and J. Wain. 2001. The *Escherichia coli* gene pool. *Curr. Op. Microbiol.* 4: 90-94.
 47. Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Diseases.* 8: 881-890.
 48. Elkins, J. G., D. J. Hassett, P. S. Stewart, H. P. Schewizer, and T. R. McDermott. 1999. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. 65: 4594-4600.
 49. Esteves, C. L. C., B. D. Jones, and S. Clegg. 2005. Biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* on epithelial cells following mixed inoculations. *Infect. Immun.* 73: 5198-5203.
 50. Federle, M. J., and B. L. Bassler. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Inves.* 112: 1291-1299.
 51. Filoche, S. K., S. A. Anderson, and C. H. Sissons. 2004. Biofilms growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immun.* 19: 322-326.
 52. Friedman, L., and R. Kolter. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51: 675-690.
 53. Froeliger, E. H., and P. Fives-Taylor. 2001. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesin Fap1 is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 69: 2512-2519.
 54. Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart, and P. Stoodley. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiol.* 13: 34-40.
 55. García, B., C. Latasa, C. Solano, F. García-del Portillo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 54: 264-277.
 56. Genevaux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega, B. 1999a. Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 403-409.

-
57. Genevoux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega. 1999b. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch. Microbiol.* 172: 1-8.
 58. Genevoux, P., S. Muller, and P. Bauda, P. 1996. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 142: 27-30.
 59. Ghigo, J.-M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 412: 442-445.
 60. Goller, C., X. Wang, Y. Itoh, and T. Romeo. 2006. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol.* 188: 8022-8032.
 61. Hall-Stoodley, L., and P. Stoodley. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *TRENDS in Microbiol.* 13: 7-10.
 62. Head, N. E. and H. Yu. 2004. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect. Immun.* 72: 133-144.
 63. Hentzer, M., K. Riedel, T. B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Andersen, M. R. Parsek, S. A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol.* 148: 87-102.
 64. Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, and M. R. Parsek. 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183: 5395-5401.
 65. Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 14422-14427.
 66. Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, and G. A. O'Toole. 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* 49: 905-918.

-
67. Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones, and S. I. Miller. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 436: 1171-1175.
68. Hope, C. K., D. Clements, and M. Wilson. 2002. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J. Appl. Microbiol.* 93: 448–455.
69. Huber, B., K. Riedel, M. Hentzer, A. Heydorn, A. Gotschlich, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol.* 147: 2517-2528.
70. Irie, Y., G. A. O'Toole, and M. H. Yuk. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 237-243.
71. Jackson, D. W., J. W. Simecka, and T. Romeo. 2002. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184: 3406-3410.
72. Jackson, D. W., K. Suzuki, L. Oakford, J. W. Simecka, M. E. Hart, and T. Romeo. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 290-301.
73. Jefferson, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 163-173.
74. Jenkinson, H. F., and H. M. Lappin-Scott. 2000. Biofilms adhere to stay. The 147th Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology was held at the University of Exeter, Exeter, UK, 12-15 September.
75. Jishage, M., and A. Ishihama. 1997. Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J. Bacteriol.* 179: 959-963.
76. Kaplan, J. B., M. F. Meyenhofer, and D. H. Fine. 2003. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* 185: 1399-1404.
77. Kaplan, J. B., C. Rangunath, N. Ramasubbu, and D. H. Fine. 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cell by an endogenous β -hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* 185: 4693-4698.
78. Kaplan, J. B., K. Velliyagounder, C. Rangunath, H. Rohde, D. Mack, J. K.-M. Knobloch, and N. Ramasubbu. 2004. Genes involved in the synthesis and

-
- degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. J. Bacteriol. 186: 8213-8220.
79. Karaolis, D. K. R., M. H. Rashid, R. Chythanya, W. Luo, M. Hyodo, and Y. Hayakawa. 2005. c-di-GMP (3' -5' -cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. 2005. Ant. Agen. Chem. 49:1029-1038.
80. Kearns, D. B., F. Chu, S. S. Branda, R. Kolter, and R. Losick. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 55: 739-749.
81. Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, and B. H. Iglewski. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. 67: 1865-1873.
82. Kjelleberg, S., and S. Molin. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? Curr. Op. Microbiol. 5: 254-258.
83. Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aes-Jorgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol. Microbiol. 48: 1511-1524.
84. Kleckner, N., J. Bender, and S. Gottesman . 1991. Uses of transposons with emphasis on Tn10. Methods Enzymol. 204: 139-180.
85. Koutsoudis, M. D., D. Tsaltas, T. D. Minogue, and S. B. von Bodman. 2006. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.. 103: 5983-5988.
86. Kolenbrander, P. E. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu. Rev. Microbiol. 54: 413-437.
87. Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Eglund, J. S. Foster, and R. J. Palmer Jr. 2002. Communication among oral bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:486-505.
88. Labbate, M. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. J. Bacteriol. 186: 692-698.
89. Lee, S. F., Y. H. Li, and G. H. Bowden. 1996. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cell by an endogenous enzymatic activity. Infect. Immun. 64: 1035-1038.

-
90. Li, Y-H., N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Y. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184: 2699-2708.
91. Lim, Y. L., M. Jana, T. T. Luong, and C. Y. Lee. 2004. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186: 722-729.
92. Lawrence, J. R., M. R. Chenier, R. Roy, D. Beaumier, N. Fortin, G. D. W. Swerhone, T. R. Neu, and C. W. Greer. 2004. Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4326–4339.
93. Lazazzera, B. A. 2005. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr. Op. Microbiol.* 8: 222-227.
94. Macedo, A. J., U. Kuhlicke, T. R. Neu, K. N. Timmis, and W-R. Abraham. 2005. Three stages of a biofilm community developing at the liquid-liquid interface between polychlorinated biphenyls and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7301–7309.
95. Marr, A. K., J. Overhage, M. Bains, and R. E. Hancock. 2007. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology.* 153: 474-482.
96. Méndez-Ortiz, M.M., M. Hyodo, Y. Hayakawa, and J. Membrillo-Hernández. 2006. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second Messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J. Biol. Chem.* 281: 8090-8099.
97. Mey, A. R., S. A. Craig, and S. M. Payne. 2005. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect. Immun.* 73: 5706-5719.
98. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
99. Mishra, M., G. Parise, K. D. Jackson, D. J. Wozniak, and R. Deora. 2005. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J. Bacteriol.* 187: 1474-1484.

-
100. Morris, C. E., J-M. Monier, and M.-A. Jacques. 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1570–1576.
 101. Narisawa, N., S. Furukawa, H. Ogihara, and M. Yamasaki. 2005. Estimation of the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12 by cell number. *J. Bios. Bioen.* 99: 78-80.
 102. Ohnishi, M., K. Kurokawa, and T. Hayashi. 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol.* 9: 481-485.
 103. Oosthuizen, M. C., B. Steyn, J. Theron, P. Cosette, D. Lindsay, A. Von Holy, and V. S. Brozel. 2002. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2770-2780.
 104. O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
 105. O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.
 106. O'Toole, G. A., L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver, and R. Kolter. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 91-109.
 107. Otto, K., J. Norbeck, T. Larsson, K.-A. Karlsson, and M. Hermansson. 2001. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 183: 2445-2453.
 108. Otto, K., and T. J. Silhavy. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2287-2292.
 109. Parsek, M. R. and C. Fuqua. 2004. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186:4427

-
110. Parsek, M. R., and E. P. Greenberg. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS in Microbiol.* 13: 27-32.
111. Paul E. Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Eglund, J. S. Foster, and R. J. Palmer Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 486–505.
112. Peacock, A. D., Y.-J. Chang, J. D. Istok, L. Krumholz, R. Geyer, B. Kinsall, D. Watson, K. L. Sublette, and D. C. White. 2004. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microbial Ecol.* 47: 284-292.
113. Perna, N. T., G. Plunkett, III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature.* 409: 529-533.
114. Petersen, F. C., L. Tao, and A. A. Scheie. 2005. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 187: 4392-4400.
115. Pratt, L. A., and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilms formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-293.
116. Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, and C. Dorel. 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol* 183: 7213-7223.
117. Prigent-Combaret, C., G. Prensier, T. T. L. Thi, O. Vidal, P. Lejeune, and C. Dorel. 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Roles of flagella, curli and colonic acid. *Environ. Microbiol.* 2: 450-464.
118. Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr. 2000. Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* 182: 6824-6826.

-
119. Rashid, M. H., and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 4885-4890.
 120. Reisner, A. 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* 48: 933-946.
 121. Ren, D., L. A. Bedzyk, S. M. Thomas, R. W. Ye, and T. K. Wood. 2004. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 515-524.
 122. Riedel, K., M. Hentzer, O. Geisenberger, B. Huber, A. Steidle, H. Wu, N. Hoiby, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2001. *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol.* 147: 3249-3262.
 123. Rickard, A. H., S. A. Leach, L. S. Hall, C. M. Buswell, N. J. High, and P. S. Handley. 2002. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3644–3650.
 124. Romling, U., and D. Amikam. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Cur. Op. Microbiol.* 9: 218-228.
 125. Römling, U., M. Gomelsky, and M. Y. Galperin. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. *Mol. Microbiol.* 57: 629-639.
 126. Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant, and T. Popovic. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emer. Infec. Dis.* 8: 1117-1123.
 127. Saint, S, and C. E. Chenoweth. 2003. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 17: 411–432.
 128. Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, and D. G. Davies. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184: 1140-1154.
 129. Sauer, K., M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. H. Zeef, D. G. Davies, and P. Gilbert. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186: 7312-7326.
 130. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-
131. Schembri, M. A., K. Kjaergaard and P. Klemm. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48: 253-267.
 132. Schembri, M. A, and P. Klemm. 2001. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO.* 20: 3074-3081.
 133. Selinger, D. W., K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, F. R. Blattner, D. J. Lockhart, and G. M. Church. 2000. RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat. Biotechnol.* 18: 1262-1268.
 134. Serres, M. H., S. Gomal, L. A. Nahuma, P. Liang, T. Gaasterland, and M. Riley. 2001. A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biology.* 2: 1-7.
 135. Sheikh, J., S. Hicks, M. Dall'Agnol, A. D. Phillips, and J. P. Nataro. 2001. Roles for Fis and Yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41: 983-997.
 136. Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm. 2004. Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186: 8058-8065.
 137. Sherlock, O., R. M. Vejborg, and P. Klemm. 2005. The TibA adhesion/invasion from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect. Immun.* 73: 1954-1963.
 138. Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Römling. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* 53: 1123-1134.
 139. Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lung are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 407: 762-764.
 140. Singh, R., D. Paul, and R. K. Jain. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *TRENDS in Microbiol.* 14: 389-397.
 141. Solano, C., B. García, J. Valle, C. Berasain, J. –M. Ghigo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43: 793-808.
 142. Sperandio, V., C. C. Li, and J. B. Kaper. 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the

-
- regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 70: 3085-3093.
143. Sperandio, V., A. G. Torres, J. A. Giron, and J. B. Kaper. 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 183: 5187-5197.
144. Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 8951-8956.
145. Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 15196-1501.
146. Spiers, A. J., and P. B. Rainey. 2005. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. *Microbiol.* 151: 2829-2839.
147. Spoering, A. L., and M. S. Gilmore. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Op. Microbiol.* 9: 133-137.
148. Stanley, N. R., and B. A. Lazazzera. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52: 917-924.
149. Stoodley, P., D. DeBeer, and H. M. Lappin-Scott. 1997. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. *Anti. Agen. Chem.* 41: 1876-1879.
150. Stoodley, P., S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, and J. W. Costerton. 2001. Growth and Detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5608-5613.
151. Sturgill, G., C. M. Toutain, J. Komperda, G. A. O'Toole, and P. N. Rather. 2004. Role of CysE in production of an extracellular signaling molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: loss of *cysE* enhances biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 7610-7617.
152. Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9: 222-227.

-
153. Sutherland, I. W., K. A. Hughes, L. C. Skillman, K. Tait. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 1-6.
154. Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann. 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 188: 2681-2691.
155. Tormo, M. A., M. Martí, J. Valle, A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa, and J. R. Penadés. 2005. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J. Bacteriol.* 187: 2348-2356.
156. Tremoulet, F., O. Duche, A. Namane, B. Martinie, and J. C Labadie. 2002. A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol. Lett.* 215: 7-14.
157. Valle, J., S. De Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, and J.-M. Ghigo. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 12558-12563.
158. Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. -M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penadés, and I. Lasa. 2003. SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48: 1075-1087.
159. Van Houdt, R., and C. W. Michiels. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156: 626-633.
160. Verma, M., and J. B. Egan. 1985. Phenotypic variations in strain AB1157 cultivars of *Escherichia coli* from different sources. *J. Bacteriol.* 164: 1381-1382.
161. Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, and P. Lejeune. 1998. Isolation of a *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilm on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* 180: 2442-2449.
162. Vieira, H. L. A., P. Freire, and C. M. Arraiano. 2004. Effect of *Escherichia coli* morphogene *bolA* on biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5682-5684.

-
163. Wang, X. 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186: 2724-2734.
164. Watnick, P., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182: 2675-2679.
165. Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol.* 39: 223-235.
166. Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov, and S. Kjelleberg. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 185: 4585-4592.
167. Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, III, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 17020-17024.
168. White, A. P., D. L. Gibson, S. K. Collinson, P. A. Banser, and W. W. Kay. 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *J. Bacteriol.* 185: 5398-5407.
169. Whiteley, M., M. G. Banger, R. E. Bumgarner, M. R. Parsek, G. M. Teitzel, S. Lory, and E. P. Greenberg. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 413: 860-864.
170. Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 661-667.
171. Wolfe, A. J., D.-E. Chang, J. D. Walter, J. E. Seitz-Partridge, M. D. Vidaurri, C. F. Lange, B. M. Prüb, M. C. Henk, J. C. Larkin, and T. Conway. 2003. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol. Microbiol.* 48: 977-988.
172. Wood, T. K., A. F. G. Barrios, M. Herzberg, and J. Lee. 2005. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 361-367.

-
173. Yamada, M., A. Ikegami, and H. K. Kuramitsu. 2005. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 271-277.
174. Yura, T., H. Mori, H. Nagai, T. Nagata, A. Ishihama, N. Fujita, K. Isono, K. Mizobuchi, and A. Nakata. 1992. Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2.4 min region. *Nucleic Acids Res.* 20: 3305-3308.
175. Zhang, L-H., and Y-H. Dong. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.
176. Zhang, X. S., R. Garcia-Contreras, T. K. Wood. 2007. YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J. Bacteriol.* 189: 3051-3062.
177. Zhu, J., and J. J. Mekalanos. 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev. Cell.* 5: 647-656.
178. Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Römling. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39: 1452-1463.

Spent media from cultures of environmental isolates of *Escherichia coli* can suppress the deficiency of biofilm formation under anoxic conditions of laboratory *E. coli* strains

Tecilli Cabellos-Avelar¹, Valeria Souza² & Jorge Membrillo-Hernández¹

¹Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas; and

²Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Correspondence: Jorge Membrillo-Hernández, Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70 228, Coyoacán, 04510, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 56223840; fax: +52 55 55500048; e-mail: jmh@biomedicas.unam.mx

Received 27 January 2006; revised 12 June 2006; accepted 13 June 2006.

First published online 1 August 2006.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00186.x

Editor: Julian Marchesi

Keywords

biofilm; *Escherichia coli*; oxygen; extracellular signaling; anaerobic growth; environmental isolates.

Introduction

It is now widely accepted that bacterial lifestyle in natural environments occurs normally as a complex group of bacteria attached to a surface in a structure called biofilm, rather than living in free-swimming, planktonic state (Costerton *et al.*, 1995). Recent genetic and genomic studies have shown that a biofilm is formed in multiple steps (Watnick & Kolter, 1999). In some organisms it requires intercellular signaling (Bassler, 1999; Shih & Huang, 2002) and a specific genetic profile of gene transcription is needed for biofilm formation (Whiteley *et al.*, 2001; Schembri *et al.*, 2003; Beloin *et al.*, 2004; Friedman & Kolter, 2004). Importantly, biofilms possess increased resistance to antimicrobial agents (Hoyle & Costerton, 1991; Ichimiya *et al.*, 1994).

Escherichia coli has been a useful model for the study of genetic determinants of biofilm formation (Genevaux *et al.*, 1996; Pratt & Kolter, 1998; O'Toole *et al.*, 1999). Mutant cells lacking flagella (*fliC*, *fliH* or *fliD*) or affected in motility (*motB*) are severely impaired in the first few steps of biofilm

Abstract

The prevailing lifestyle of bacteria is sessile and they attach to surfaces in structures known as biofilms. In *Escherichia coli*, as in many other bacteria, biofilms are formed at the air-liquid interface, suggesting that oxygen has a critical role in the biofilm formation process. It has been reported that anaerobically growing *E. coli* laboratory strains are unable to form biofilms even after 96 h of incubation on Luria Bertani (LB) medium. After analyzing 22 000 transposon-induced and 26 000 chemically-induced mutants we failed to isolate an *E. coli* laboratory strain with the ability to form biofilm under anaerobic growth conditions. Notably, seven strains from a collection of *E. coli* isolated from different hosts and the environment had the ability to form biofilm in the absence of oxygen. Interestingly, spent medium from cultures of one strain, Souza298, can promote biofilm formation of *E. coli* laboratory strains growing under anaerobic conditions. Our results led us to propose that laboratory *E. coli* strains do not release (or synthesize) a molecule needed for biofilm formation under anoxic conditions but that they bear all the required machinery needed for this process.

formation (Pratt & Kolter, 1998). Recently, CsrA and RpoS were identified as key regulators of biofilm formation (Adams & McLean, 1999; Jackson *et al.*, 2002; Corona-Izquierdo & Membrillo-Hernández, 2002a). In addition, the formation of biofilms is strongly influenced by the nutritional environment (Pratt & Kolter, 1998; O'Toole *et al.*, 1999) and very recent reports have involved the molecular signal c-di-GMP in the formation of biofilms (Galperin, 2004; Römling *et al.*, 2005; Méndez-Ortiz *et al.*, 2006).

The experimental approach for genetic studies on biofilm formation was originally designed by Genevaux *et al.* and then widely used in *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by O'Toole and Kolter (Genevaux *et al.*, 1996; O'Toole & Kolter, 1998a, b). In this standard protocol, cells are first grown for 24–48 h without shaking in polyvinyl chloride (PVC) microtitre dishes. Then wells are rinsed with water and subsequently stained with 1% crystal violet for 20 min. This staining procedure allows the visualization of cells that are attached to the PVC surface, as such cells are stained purple

Universidad Nacional Autónoma de México

biología oral



9 y 10
audi

Fac

11 de Diciembre

Disco Compacto, elaborado por
el Laboratorio de Bioquímica de
DEPeI de la Fac. de Odontología,
UNAM. México 2005
ISBN: 970-32-3169-7

ISBN 970-32-3169-7



9 789703 222612

Contenido Temático

Introducción

Salud Bucal de los Ancianos

Dra. Aída Borges 4

Las moléculas y las células detrás de las alergias

Dra. Claudia González Espinosa 15

Hipertensión y diabetes. ¿Dos historias diferentes?

Dr. Alberto Olivares Reyes 26

Biología Molecular de la Formación de Bicapas Bacterianas

Dra. Tecilli Cabellos-Avelar y Dr. Jorge Membrillo-Hernández 43

Avances en el Estudio de la Patología gástrica inflamatoria

Marisela Olguín Martínez y Dr. Rolando Hernández Muñoz 54

El Caso de SIDA Oral

Dr. Luis Gaytán Cepeda, Martínez-González M. y Leyva-Huerta E. 68

El Factor de Crecimiento transformante beta (TGF beta) y la regeneración hepática

Dra. Marina Macias Silva 75

Adaptaciones de los Mecanismos de Transducción en Protozoarios

Parásitos

Dra. María Eugenia Torres Márquez y Alicia Vega [86](#)

Factores Etiológicos de la Enfermedad Pulpo Periapical

Dr. Luis García Aranda [98](#)

Estructura y Función de las Uniones Estrechadas

Dra. Erika P. Rendón Huerta y Georgina Álvarez-Fernández [113](#)

Las Endotoxinas y sus Mecanismos de acción en el desarrollo de la enfermedad periodontal

Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas, Santa Rita Arroyo- Cruz, Perla Kawasaki- Cárdenas, Miguel Pérez-Garzón y Silvia Maldonado-Frias. [132](#)

..... [150](#)

Directorio

..... [153](#)

Programa

.....

INTRODUCCIÓN

El logro en los tratamientos Odontológicos depende en gran medida del manejo del paciente como un todo. Es decir el padecimiento bucal puede ser una repercusión de disfunciones en el tracto gastrointestinal.

En la actualidad los pacientes no se sienten satisfechos con tratamientos que estén encaminados a detener el progreso de las enfermedades. Por tanto es compromiso del Cirujano Dentista encaminar los tratamientos hacia el área de prevención y de la regeneración de los tejidos dañados.

En la actualidad los Cirujanos Dentistas no deben circunscribir la afección bucal al ámbito de su competencia sino que deben tener un profundo conocimiento del tracto digestivo, ya que una serie de padecimientos gastrointestinales pueden provocar enfermedades en cavidad bucal. Por ejemplo pacientes diabéticos por lo general presentan enfermedad periodontal, de igual forma pacientes que son sometidos a quimioterapia presentarán afecciones similares y por radioterapia en cabeza y cuello padecerán de caries.

Este libro es producto del II Congreso de Biología Oral y es el testimonio escrito de los ponentes que participaron en el mencionado Congreso. Los ponentes, comprenden un grupo de prestigiados investigadores de diferentes centros del país y que trabajan en el tema que abordaron durante su ponencia. Su obra ha sido extensamente publicada en revista internacionales y muchos de ellos han trabajado también con grupos en el extranjero y continúan colaborando a distancia.

En este libro se recopilaron temas relacionados con la epidemiología de la salud bucal en los ancianos; sobre los mecanismos moleculares de las alergias; sobre la relación entre diabetes e hipertensión; en la formación de biocapas; en patología gástrica; sobre SIDA oral; de las moléculas involucradas en la regeneración; sobre los mecanismos de comunicación de los parásito; las uniones estrechas y su relación el cáncer y finalmente sobre las toxinas y la enfermedad periodontal.

Los capítulos enumerados anteriormente constituyen las líneas esenciales de un inmenso campo de gran complejidad, por lo que en este libro se aborda de forma resumida algunos de los diferentes campos en la investigación gastrointestinal.

Finalmente, los capítulos reseñados en este libro pretenden ser una guía útil para consulta de profesores y estudiantes que deseen integrarse en un campo que está experimentando un crecimiento notable en el ámbito de la biomedicina.

Ciudad Universitaria a diciembre del 2005

Gloria Gutiérrez – Venegas.
Editor.

Salud Bucal de los ancianos

Dra. S. Aída Borges Yáñez

Introducción

El progresivo aumento en el número de ancianos, el incremento en la esperanza de vida, así como, las deficientes condiciones de salud que caracterizan a la mayoría de las personas mayores de 60 años indican que en el futuro cercano las necesidades de atención para los ancianos serán mucho mayores y que el gasto en atención a este grupo aumentará. Con excepción del carcinoma oral o faríngeo, las enfermedades bucales rara vez son mortales, sin embargo, son importantes cuando el estado de salud bucal influye sobre la calidad de vida. Las deficientes condiciones dentales en los ancianos representan un reto para su atención ya que las barreras estructurales y de actitud evitan el uso de los servicios dentales. La percepción de las personas ancianas sobre el bienestar, la capacidad para comunicarse y socializar o mantener una buena nutrición puede depender de un buen estado de salud bucal y de una buena higiene.

Envejecimiento

El envejecimiento provoca cambios fisiológicos, psicológicos y sociales en el humano. Estos cambios provocan una disminución en las reservas e incrementan la posibilidad de mal funcionamiento en circunstancias de actividad. Las causas de muerte son las enfermedades desarrolladas en esta etapa y pocas veces el envejecimiento. Cuando el organismo ha alcanzado la madurez fisiológica, es mayor la velocidad de los cambios degenerativos presentados en todos los componentes del cuerpo humano, durante el proceso de crecimiento.

Lo importante en el envejecimiento de una población no es la edad que vayan alcanzando y sobrepasando sus integrantes, sino las modificaciones en las condiciones de salud, capacidad económica y autonomía social que se asocian con la edad avanzada. De los elementos que marcan la vejez, los más determinantes y claros son los que provienen de las condiciones de deterioro de la salud por

enfermedades crónicas, degenerativas e incapacitantes.¹ Las manifestaciones de enfermedad en los ancianos se alejan de las enfermedades agudas e infecciosas y son cada vez más importantes las condiciones crónicas. Son condiciones incurables y progresivas con consecuencias a largo plazo en cuanto a sufrimiento, costos y necesidades de apoyo².

Envejecimiento en México

El envejecimiento de la población mexicana es un fenómeno que se refleja en la transición demográfica y la epidemiológica. Esta interacción lleva a nuevos problemas de salud que están afectando y afectarán a las personas ancianas. Esta situación pone en competencia la asignación de recursos para la atención de enfermedades e influye claramente en la definición de políticas en esta materia. La transición demográfica causada por la disminución en las tasas de mortalidad y fertilidad se muestra por el aumento de dos indicadores: la mediana de edad y el porcentaje de personas ancianas en la población. Las proyecciones de población³ indican que las poblaciones de adultos mayores abarcarán cada vez mayor proporción de la población total: la concentración aumentará de 4.8% en 2000 a 6.2% en 2010, a 13.2% en 2030 y será de 24.6% en 2050. Como consecuencia de ese paulatino envejecimiento de la población la edad media aumentará de 26.7 años en 2000, a 30.3 en 2010, 38.1 para 2030 y 45.1 años en 2050.¹

Aspectos Bucales del Envejecimiento

Como consecuencia del avance de la edad se presentan complicaciones como son: Atrición y abrasión causada por el uso de los dientes; pérdida dental como resultado de caries y/o enfermedad periodontal; lesiones de la mucosa oral; hiposalivación; prótesis mal ajustadas; migración dental seguida por pérdida del diente en la misma arcada o en la arcada opuesta; y disminución de la eficiencia masticatoria posterior a la pérdida de dientes. También hay una pérdida parcial del sentido del gusto y del olfato. El número de papilas gustativas disminuye con la edad; aquéllas que detectan lo dulce y lo salado se deterioran primero, quedando las que detectan lo ácido y lo amargo.⁴⁻⁸

Se han llevado a cabo pocos estudios longitudinales sobre las condiciones bucales en los ancianos.⁹⁻¹³ La mayoría se han realizado en Europa y Estados Unidos, donde las condiciones económicas y de servicios de salud son más favorables, puesto que hay gran variedad de medidas preventivas, el acceso a los servicios dentales es fácil, y los

esquemas de seguros privados son muy utilizados. Esta situación favorece el tratamiento, y entre los adultos europeos y norteamericanos las obturaciones constituyen la mayor parte de la “experiencia de caries”. Debe considerarse que la mayoría de la población mundial no tiene acceso a la atención dental organizada, tampoco tiene la costumbre de una adecuada higiene bucal. Lo que hace necesario conocer el comportamiento de los padecimientos dentales en poblaciones de este tipo.

Factores de riesgo

Las variables que han sido identificadas ¹⁴⁻¹⁶ como factores asociados con la progresión de las enfermedades dentales en los ancianos son: Edad, sexo, estado civil, educación, ingreso, auto percepción del estado de salud general, presencia de padecimientos crónicos, limitación en las actividades de la vida diaria, número de medicamentos prescritos, tabaquismo ¹⁷, frecuencia y cantidad de alimentos azucarados consumidos el día anterior, frecuencia de cepillado dental, visitas regulares al dentista, número de dientes presentes, media de pérdida de inserción del ligamento periodontal, número de dientes cariados y/o perdidos por caries, superficies radiculares cariadas u obturadas, utilización de prótesis parciales removibles.

Estudios sobre salud bucal de ancianos en México

Entre los estudios transversales realizados en México, dos de ellos efectuados en población abierta ^{18,19} reportan una prevalencia de edentulismo similar (26.8% y 23.6% respectivamente) y una media CPOD de 16.5 y 16.3 respectivamente, en ambos estudios el componente principal del CPOD fue el de dientes perdidos. Otros resultados fueron: la prevalencia de caries radicular (40.2%) y el promedio de superficies afectadas por caries radicular (2.7). ¹⁴ 50% de la población presentaba bolsas periodontales. ²⁰ Estudios en otro tipo de población de la Ciudad de México mostraron que la prevalencia de edentulismo en pacientes de 60 años y más que solicitaron atención dental en una escuela de Odontología fue 7.5%, mientras que, en ancianos de una casa hogar fue 65%. ^{20,21}

Prevalencia e incidencia de caries

Se ha pensado que la incidencia de caries es constante en los diferentes grupos de edad.^{22,23} Las nuevas lesiones se desarrollan, y aquellas ya presentes progresan continuamente a menos que se interfiera con el proceso carioso. Fure, en Suecia²⁴ observó que el porcentaje de incremento de superficies radiculares afectadas por caries en cinco años aumentó con la edad de 2.7% en las personas de 60 años a 4.8% en las de 70 años y 10.7% en las de 80 años. Aquellas personas con lesiones cariosas al inicio desarrollaron nuevas lesiones en los márgenes de las restauraciones recientemente colocadas. Drake y colaboradores, encontraron que la tasa anual de incremento de caries fue de 1.2 superficies por cada 100 superficies en riesgo.²¹ Un estudio realizado en Canadá, reportó que después de tres años 27.4% de los ancianos estudiados tuvieron al menos una raíz cariada o perdida por caries, el promedio de incremento fue de 0.6 superficies por persona.¹⁸

La prevalencia de caries en las personas ancianas es mayor que en las personas más jóvenes, varía entre 13 y 89% y está asociado con las superficies en riesgo.²⁵⁻²⁷ 94% de los ancianos en Estados Unidos mostraron experiencia de caries dental.²⁸

Edentulismo

Con respecto del edentulismo, se ha observado una disminución de la prevalencia en países industrializados entre 15% y 20%, y 5% a 10% en Suecia y Finlandia en un periodo de 20 años. En Canadá, disminuyó de 26% a 20% entre 1980 y 1993.^{12,29-34} En Estados Unidos, la prevalencia en personas de 70 años y más fue 37% en 1996.³⁵ La Encuesta Nacional de Salud de los Estados Unidos, reportó que los México-americanos tuvieron las tasas más altas de edentulismo.³⁶

Enfermedad Periodontal

En relación con la incidencia de enfermedad periodontal, en Suecia, se encontró que al hacer una comparación en un periodo de 10 años entre fumadores y no fumadores la salud periodontal de los no fumadores permaneció igual, mientras que, la severidad de la enfermedad periodontal aumentó en el grupo de fumadores.³⁷ Un estudio en China,³⁸ encontró que prácticamente todas las personas experimentaron una pérdida de inserción igual o mayor de dos milímetros en un periodo de 10 años. Otro estudio en los Estados Unidos,³⁹ evaluó la pérdida de inserción en un grupo de ancianos en un periodo de 10 años. Se encontró que solo se presentaron cambios leves en la severidad de pérdida de inserción y que hubo aumento de la pérdida de inserción, pero no estuvo relacionada con la edad o el sexo de la persona. Algunos factores de

riesgo identificados ⁴⁰ son: tabaquismo, enfermedades sistémicas, presencia previa de bolsas periodontales

La prevalencia de la enfermedad periodontal ha sido estimada hasta en un 70% en adultos ⁴¹ en los Estados Unidos. En el año de 1985-86 en los Estados Unidos ⁴² se reportó que el 34% de los adultos mayores de 60 años tenían al menos un sitio con pérdida de inserción > de 6 mm. y 98% con al menos un sitio con pérdida de inserción \geq 2 mm.

Lesiones en Mucosa Bucal

Según la organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS),⁴³ de todas las neoplasias malignas 5% corresponden a cáncer de cavidad bucal y faríngea, a pesar de la manifestación de neoplasias cancerizables y el acceso directo a esta cavidad mediante la inspección visual y táctil, en muchos casos las neoplasias cancerizables se diagnostican en estadios avanzados de extensión y metástasis; en consecuencia, solamente 50% de las personas diagnosticadas con cáncer bucal sobreviven cinco años después del diagnóstico. Cerca del 96% de tumores malignos corresponden a carcinomas de los que 90% son de tipo epidermoide, uno de los principales factores de riesgo es el consumo de tabaco y alcohol, ^{44,45} así como, a edad, el uso de dentaduras totales y parciales.^{46,47} La prevalencia en la población anciana usualmente se ve disminuida a un número restringido de neoplasias. ^{48,49} En Malasia, se reportó que las neoplasias cancerizables llegan a constituir el 22.8% de las neoformaciones en la población general. ⁵⁰ Un estudio realizado en los Estados Unidos, reportó que solo dos de 53 pacientes con neoplasias malignas en boca se realizaban autoexámenes de la cavidad bucal previo al hallazgo de la lesión. Asimismo, 87% de los pacientes ignoraron los signos tempranos del cáncer de cavidad oral.⁴⁸

Salud general y salud bucal

La declinación funcional del anciano puede ser un proceso lento y progresivo, y también es posible que sea tan sutil que los miembros y la familia no detecten lo que está sucediendo, permitiendo así el paso de la molestia al impedimento y de ahí a la discapacidad. Existen individuos susceptibles a experimentar este proceso, los llamados "ancianos frágiles", aunque los criterios para definir fragilidad se mantienen hasta hoy día sin consenso ⁵¹, un anciano frágil es aquel que depende de otros para

realizar actividades de la vida diaria, o bien que se encuentra en muy alto riesgo de volverse dependiente.⁵²

Se han propuesto diferentes marcadores de fragilidad como la inactividad física y la ingesta calórica reducida. Un índice de masa corporal bajo y la pérdida de peso han sido asociados con un pobre estado de salud y discapacidad. En especial la pérdida de peso involuntaria ha sido asociada a un pobre estado de salud bucal.⁵³ Asimismo, se ha asociado el estado de salud oral con el deterioro cognitivo de los ancianos, situación que los vuelve frágiles y particularmente susceptibles a la morbilidad, en el aspecto oral el descuido y negligencia hacia la higiene bucal se hace evidente al comprobar que los ancianos con demencia presentan mayor acumulo de placa dentobacteriana, sangrado gingival y calculo dental, las dentaduras se encuentran en peor estado.^{54,55} La higiene bucal deficiente, aunado a la disminución en el flujo salival que presentan este tipo de pacientes⁵⁶ favorecen el proceso de múltiples desordenes orales que pueden provocar dolor, pérdida de la función masticatoria, disminución del placer a la comida, todo ello repercute directamente en la calidad de vida del paciente.

57

Salud Dental y Alimentación en los Ancianos

Muchas personas después de los 65 años de edad excluyen los alimentos difíciles de masticar de su dieta debido a trastornos dentales, lo que ocasiona que los alimentos ricos en proteínas y fibras sean los primeros en eliminarse a pesar de la necesidad de éstos.^{58,59} Se ha observado que los ancianos con dientes tienen mejor estado de nutrición que aquellos con pocos dientes o con dentaduras y prótesis removibles.^{60,61} La información disponible sugiere que el deterioro en la función masticatoria es en gran parte responsable de que los ancianos consuman predominantemente alimentos, suaves y fáciles de masticar, los cuales, a su vez, pueden inducir prácticas dietéticas pobres en nutrientes.⁶² Varios estudios^{63,64} han reportado que aquellas personas que utilizan dentaduras consumen más carbohidratos y sacarosa, menos alimentos con fibra y vitamina A. Otro estudio en Europa, indica que en las personas edéntulas y sin prótesis, la ingestión de carbohidratos y vitamina B6, vitamina B1, vitamina C, fibra dietética, calcio y hierro se reduce significativamente⁶⁵. Existe evidencia de que el decremento en la calidad y la cantidad de la dentición producen deficiencias en la masticación hasta de 40%, que conllevan a una alteración en la elección y consumo de los alimentos.^{66,67} Otras variables que se encuentran asociadas con una deficiente nutrición son: bajo nivel educacional, poco ingreso familiar, tabaquismo, consumo de

medicamentos, edad avanzada, sexo, condición de vivienda y conducta dietética.^{61, 68-70}

Conclusiones

En general, la salud bucal en los ancianos es deficiente. La caries coronal, radicular, el edentulismo, la periodontitis, las lesiones de la mucosa bucal y las prótesis en mal estado son problemas comunes en esta población. También se ha identificado la asociación entre la salud bucal y la salud general, y el impacto de la salud bucal en la calidad de vida de los ancianos. Los efectos de la transición demográfica y epidemiológica tendrán como resultado que en un futuro cercano las necesidades de atención a la salud se incrementen para las personas que pasen los 60 años de edad. Es importante realizar más investigación para conocer las condiciones de salud bucal de la población anciana en México, identificar los factores de riesgo asociados con una deficiente salud bucal, así como, la asociación de las condiciones bucales con la salud general. De esta manera, se podrán identificar los grupos de alto riesgo para estimar las necesidades de tratamiento y decidir sobre la implementación de programas de promoción y educación para la salud dental. Sí como contar con una base para el desarrollo de futuros estudios y para la planificación de los futuros servicios de salud.

Referencias

- ¹ Lozano, R., J. Frenk y M.A. González Block. El peso de la enfermedad en adultos mayores, México. 1994. *Revista Salud Pública de México* 1996; 38: 419-437.
- ² Puentes-Markides, Cristina y J. Castellanos. Informe final. Reunión de Consulta sobre Políticas de Salud para los Ancianos de América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud, 1992.
- ³ [www. Conapo.gob.mx/indsociodemo/](http://www.conapo.gob.mx/indsociodemo/) Proyecciones de población en México. Censo de población 1995.
- ⁴ Nutrition risks for the elderly. Understanding nutritional needs and life style. Cooperative Extension Program College of Agriculture, Home Economics, and Allied Programs Fort Valley State University. <http://www.ag.fvsu.edu/html/publications/teletips/diet/1940.htm>.
- ⁴ Dunning J. Principles of Dental Public Health. 3rd Ed. Harvard University Press. 1979.
- ⁶ Brocklehurst J.C. Textbook of geriatric Medicine and gerontology. Churchill Livingstone. 2nd edition, 1980.
- ⁷ Brown LJ, Winn DM, White BA Dental caries, restoration and tooth conditions in U.S. adults, 1988-1991. Selected findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Dent Assoc* 1996 Sep;127(9):1315-1325.
- ⁸ Brown L, Brunelle J, Kingman. Periodontal status in the United States, 1988-91: Prevalence, Extent and Demographic Variation. *Journal of Dental Research* 1996;75: 672-683.
- ⁹ Locker D. Incidence of root caries in an old Canadian Population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996; 24: 403-7.
- ¹⁰ Luan W, Baelum V, Fejerskov O, Chen X. Ten-year incidence of dental caries in adult and elderly Chinese. *Caries Res.* 2000 May-Jun;34(3):205-13
- ¹¹ Fure S, Zickert I. Incidence of tooth loss and dental caries in 60- 70- and 80-year-old Swedish individuals. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996; 25: 137-42.
- ¹² Drake CW, Beck JD, Lawrence HP, Koch GG. Three-year coronal caries incidence and risk factors in North Carolina elderly. *Caries Res.* 1997;31(1):1-7.
- ¹³ Gilbert GH, Foerster U, Dolan TA, Duncan RP, Ringelberg ML. Twenty-four month coronal caries incidence: the role of dental care and race. *Caries Res.* 2000 Sep-Oct;34(5):367-79.
- ¹⁴ Hawkins RJ, Jutai DK, Brothwell DJ, Locker D. Three-year coronal caries incidence in older Canadian adults. *Caries Res.* 1997;31(6):405-10.
- ¹⁵ Powell LV, Leroux BG, Persson RE, Kiyak HA: Factors associated with caries incidence in an elderly population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 170-6.
- ¹⁶ Suominen-Taipale AL, Alanen P, Helenius H, Nordblad A, Uutela A. Edentulism among Finnish adults of working age, 1978-1997.. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27:353-65.
- ¹⁷ Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol.* 2000;71:1874-81.
- ¹⁸ Borges A. Prevalencia de Caries Coronal Y Radicular en una Población Anciana de la Ciudad de México. *Revista de la División de Estudios de Posgrado e Investigación* 1999; 3: 25-32.
- ¹⁹ Irigoyen ME, Velázquez, Zepeda MA, Mejía A. Caries dental y enfermedad periodontal en un grupo de personas de 60 o más años de edad de la Ciudad de México. *Rev ADM* 1999; 56: 64-69.
- ²⁰ Borges Yáñez SA, Maupomé Carvantes G, Tsuchiya López JE. Características sociodemográficas y condiciones generales en un grupo de pacientes mayores de 60 años, atendidos en una clínica universitaria en 1991. *Dentista y Paciente*; 1: 20-28.

- ²¹ Soto SC, Rubio J, Taboada O, Mendoza VM. Patología bucal en el senecto: un estudio exploratorio. *Dentista y Paciente* 1998; 7: 20-26.
- ²² Manji F, Fejerskov O, Baelum V. Pattern of dental caries in an adult rural population. *Caries Res* 1989;23:55-62.
- ²³ Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25: 5-12.
- ²⁴ Fure S. Five-year incidence of coronal and root caries in 60-, 70- and 80-year-old Swedish individuals. *Caries Res* 1997;31(4):249-58
- ²⁵ Wallace M, Et al. The 48 month increment of root caries in an urban population of older adults participating in a preventive dental program. *Journal of Public Health Dentistry* 1993; 53: 133-7.
- ²⁶ Joshi A, Douglass CW, Jette A, Feldman H. The distribution of root caries in a community dwelling elders in New England. *J Public Health Dentistry* 1994; 54: 15-23.
- ²⁷ Lundgren M, Emilson CG, Osterberg T. Caries prevalence and salivary and microbial conditions in 88 year-old Swedish dentate people. *Acta Odontol Scand* 1996; 54: 193-199.
- ²⁸ Winn DM, Brunelle JA, Selwitz RH, et al. Coronal and root caries in the dentition of adults in the United States, 1988-1991. *J dental Research* 1996;75 Spec N°:642-651.
- ²⁹ Osterberg T, Carlsson GE, Sundh V. Trends and prognoses of dental status in the Swedish population: analysis based on interviews in 1975 to 1997 by Statistics Sweden. *Acta Odontol Scand*. 2000; 58:177-82.
- ³⁰ Ahlqwist M, Bengtsson C, Hakeberg M, Hagglin C. Dental status of women in a 24-year longitudinal and cross-sectional study. Results from a population study of women in Goteborg. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57: 162-7.
- ³¹ CDC. Total tooth loss among persons aged > or =65 years--selected states, 1995-1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999 19;48: 206-10.
- ³² Hiidenkari T, Parvinen T, Helenius H. Edentulousness and its rehabilitation over a 10-year period in a Finnish urban area. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25:367-70.
- ³³ Osterberg T, Carlsson GE, Sundh W, Fyhrlund A. Prognosis of and factors associated with dental in the adult Swedish population, 1975-1989. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1995;23:232-6.
- ³⁴ Brodeur JM, Benigeri M, Naccache H, Olivier M, Payette M. Trends in the level of edentulism in Quebec between 1980 and 1993. *J Can Dent Assoc*. 1996;62:159-60, 162-6
- ³⁵ Marcus PA, Joshi A, Jones JA, Morgano SM. Complete edentulism and denture use for elders in New England. *J Prosthet Dent*. 1996 Sep;76(3):260-6.
- ³⁶ Marcus SE, Drury TF, Brown LJ, Zion GR. Tooth retention and tooth loss in the permanent dentition of adults: United States, 1988-1991. *J Dent Res*. 1996 Feb;75 Spec No:684-95.
- ³⁷ Bergstrom J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*. 2000;71:1338-47.
- ³⁸ Baelum V, Luan WM, Chen X, Fejerskov O. A 10-year study of the progression of destructive periodontal disease in adult and elderly Chinese. *J Periodontol*. 1997 Nov;68(11):1033-42.
- ³⁹ Ship JA, Beck JD. Ten-year longitudinal study of periodontal attachment loss in healthy adults. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Mar;81(3):281-90.
- ⁴⁰ Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *Clin Periodontol* 1999 Jun;26(6):374-80
- ⁴¹ Miller A., Brunelle J., Carlos J., Brown L., Loe H. Oral health of United States adults. The National Survey of Oral Health in U.S. employed adults and seniors:1985-1986, National findings. *Epidemiology and Oral Disease Prevention Program*. National

Institute of Dental Research. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health. NIH Publication No 87-2868 August 1987. p.p. 9-11, 164-165.

⁴² Burt A., Ismail A. Eklund S. Periodontal disease, tooth loss, and oral hygiene among older americans. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1985; 13: 93-96.

⁴³ Organización Panamericana De La Salud, enfermedad y daños a la salud. La salud en las Americas 1998; vol. I: 202-210.

⁴⁴ Jeffrey Crawford, Harvey J. Cohen. aging and neoplasia. *Yearbook Of Gerontology biological sciences* 1988 pp3-32.

⁴⁵ Marciera-Coelho. *Cancer And Aging, experimental gerontology* 1986; 21: 483-495.

⁴⁶ Jean-Pierre Thouez, Jean-Francois Emard, Michael Beaupre, Jean Latreille, Parviz Ghadirian, *Analyse espace/temps de l'incidence de certains sièges de cancer au Québec, Canadian Journal Of Public Health* 1997; 88(1):48-51.

⁴⁷ Rubright WC, Hoffman HT, Lynch CF, Kohout FJ, Robinson RA, Graham S, Funk G, McCulloch T. Risk factors for advanced-stage oral cavity cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;122:621-6.

⁴⁸ Slavkin H. Clinical dentistry in the 21st Century. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod*; 18(3):212-218.

⁴⁹ Fantasia JE. Diagnosis and treatment of common oral lesions found in the elderly. *Dent Clin North Am* 1997 Oct;41(4):877-90.

⁵⁰ Taiyeb T.B, Razak L.A, Raja Latifah R.J, Zain R.B., An epidemiological survey of oral mucosal lesions among elderly Malasians. *Gerontology* 1995; 12 (1): 37-40.

⁵¹ Marijke J. M. Paw C, Dekker J M, Feskens E, Schouten E., Kromhout D, How to select a frail elderly population? A comparison of three working definitions, *Journal of Clinical Epidemiology*, 1999; 52: 1015-1021.

⁵² Rockwood K, Fox R., Stooles P, Robertson D, Beattie L, Frailty in elderly people: an evolving concept. *Canadian Medical Association* 1994; 150:489-494.

⁵³ Sullivan D, Martin W, Flaxman N, Oral Health problems and involuntary weight loss in a population of frail elderly. *Journal of the American Geriatric Society* 1993;41: 725-731.

⁵⁴ Ghezzi E, Ship J. Dementia and oral health, Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics 2000; 89:2-5.

⁵⁵ Weeks JC, Fiske J. Oral care of people with disability: a qualitative exploration of the views of nursing staff. *Gerodontology* 1994; 11(1):13-17.

⁵⁶ Ship J, Puckett S, Longitudinal study on oral health in subjects with Alzheimer's disease, *Journal American Geriatrics Society*, 1994; 42:57-63.

⁵⁷ Nordenram G, Ronnberg L, Winblad B. The perceived importance of appearance and oral function, comfort and health for severely demented persons rated by relatives, nursing staff and hospital dentists. *Gerodontology* 1994; 11(1): 18-24.

⁵⁸ Marshall J. et al. Indicator of nutritional risk in a rural elderly Hispanic and no Hispanic white population: San Luis Valley Health and Aging Study. *J Am Diet Assoc.* 1999; 99:315-322.

⁵⁹ McIntosh W, Kubena K, Smith D. The relationship between beliefs about nutrition and dietary practices of the elderly. *J Am Diet Assoc* 1990; 90; 671-676.

⁶⁰ Papas AS, Palmer CA, Rounds MC, Russell RM. The effects of denture status on nutrition. *Spec Care Dentist* 1998;18:17-25.

⁶¹ Borges-Yanez SA, Maupome G, Martinez-Gonzalez M, Cervantez-Turrubiante L, Gutierrez-Robledo LM. Dietary fiber intake and dental health status in urban-marginal, and rural communities in central Mexico. *J Nutr Health Aging.* 2004;8(5):333-9.

⁶² Chauncey H, Muench M, Kapur K, Wayler A. The effect of loss of teeth on diet and nutrition. *International Dental Journal* 1984; 34: 98-104.

⁶³ Papas AS, Joshi A, Giunta JL, Palmer CA. Relationships among education, dentate status, and diet in adults. *Spec Care Dentist* 1998;18:26-32.

⁶⁴ Laurin D, Brodeur JM, Bourdages J, Vallee R, Lachapelle D Fibre intake in elderly individuals with poor masticatory performance. *J Can Dent Assoc* 1994 May;60(5):443-6, 449

⁶⁵ Fontijn-Tekamp FA, van 't Hof MA, Slagter AP, van Waas MA. The state of dentition in relation to nutrition in elderly Europeans in the SENECA Study of 1993. *Eur J Clin Nutr* 1996;50 Suppl 2:S117-22

⁶⁶ Ship J, Duffy V, Jones J. Geriatric oral health and its impact on eating, *Journal of American Geriatric Society* 1996; 44:456-464.

⁶⁷ Mojon P, Budtz-Jorgensen E, Rapin C-H. Relationship between oral health and nutrition in very old people. *Age and Ageing* 1999; 28:463-468.

⁶⁸ Sullivan DH, Martin W, Flaxman N, Hagen JE. Oral health problems and involuntary weight loss in a population of frail elderly. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:725-31.

⁶⁹ Posner BM, Jette A, Smigelski C, Miller D, Mitchell P. Nutritional risk in New England elders. *J Gerontol* 1994;49:M123-32.

⁷⁰ Saunders MJ. Nutrition and oral health in the elderly. *Dent Clin North Am* 1997;41:681-98.

Las células y las moléculas responsables de las respuestas alérgicas

Dra. Claudia González Espinosa

Las enfermedades alérgicas afectan a una gran proporción de la población mundial. En países con estudios estadísticos disponibles, como los Estados Unidos, se calcula que el 20 % de su población sufre rinitis alérgica, mientras que el 7% sufre asma y el 2% presenta otras hipersensibilidades. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del mundo existen 150 millones de personas alérgicas en distintos grados a diversas sustancias. Hasta hace pocos años se creía que las alergias eran padecimientos típicos de países desarrollados, pero resultados de estudios epidemiológicos confiables han demostrado que esto no es del todo cierto. En México, por ejemplo, el asma y la bronquitis crónica son responsables de 15 000 muertes anuales en población abierta, colocando a estos padecimientos como la decimotercera causa de muerte en nuestro país. Paralelamente, diversos estudios calculan que entre el 15 y el 20% de la población mexicana, ha presentado alguna reacción de hipersensibilidad tipo I (alergia) antes de los 25 años.

Las reacciones de hipersensibilidad son frecuentes en la cavidad oral y, debido a que algunos de los alérgenos más frecuentes son alimentos, los pacientes alérgicos presentan reacciones en la mucosa oral poco después del contacto con esos compuestos. De esta forma, suele ser la mucosa oral el primer tejido donde los síntomas de las alergias a los alimentos se manifiestan. Las reacciones alérgicas en la cavidad oral más comunes son la estomatitis de contacto (Figura 1) y el angioedema adquirido (Figura 2). En la estomatitis de contacto, los síntomas habituales ante la presencia de un alérgeno son el eritema y el edema. Si resulta afectada la encía, el tejido adquiere un color rojo intenso uniforme en todos los cuadrantes. Un estudio más detallado muestra que los capilares superficiales están engurgitados e inyectados. Los labios se afectan con frecuencia, apareciendo hinchados, eritematosos y con áreas erosivas y ulceraciones crónicas. Los pacientes se quejan de quemazón y sensibilidad ante el calor, el alcohol, y alimentos y líquidos picantes. La alergia frente al material base de prótesis es rara y se produce cuando el material acrílico no se ha secado completamente. En el angioedema adquirido, se presenta una tumefacción rápida y recidivante de labios y estructuras adyacentes en pacientes susceptibles. Es peligroso cuando afecta estructuras anatómicas más posteriores, ya que puede comprometer la vía aérea, dando lugar a una urgencia médica. Al cesar el contacto con el alérgeno, la tumefacción cede rápidamente por sí sola, generalmente después de 24 a 48 horas.

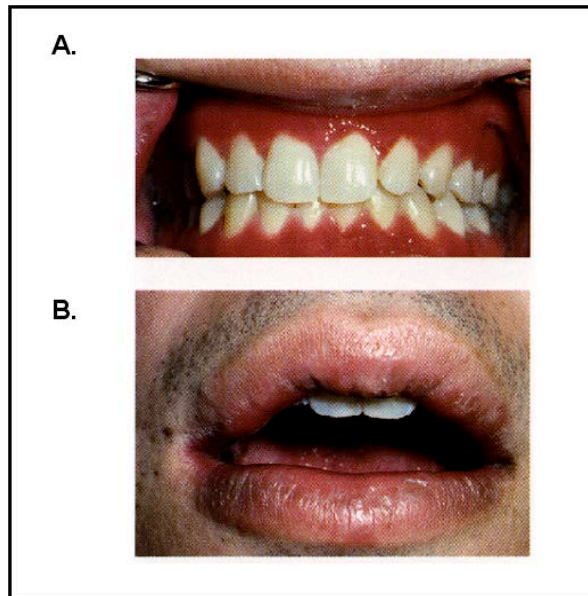


Figura 1. Una de las principales manifestaciones de las alergias en la mucosa oral es la estomatitis de contacto, la cual se caracteriza por un enrojecimiento generalizado del tejido, comezón e hipersensibilidad a temperatura y sabores extremos (A). Estos síntomas suelen manifestarse también en los labios, que pueden mostrar irritación y un edema fácilmente observable (B). Figura tomada de la referencia 2.

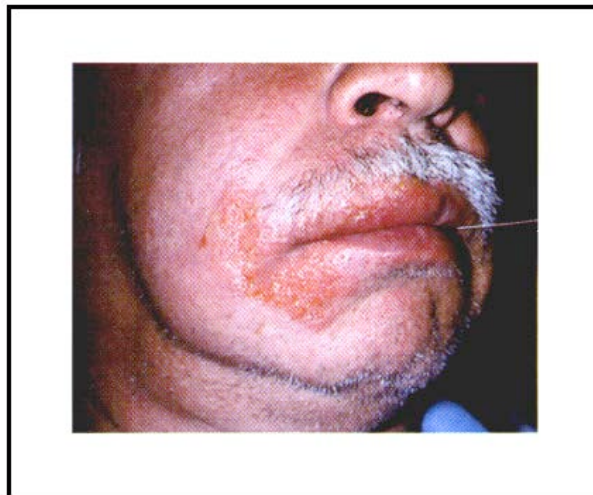


Figura 2. El angioedema adquirido suele ser una manifestación que precede a reacciones alérgicas generalizadas. Se caracteriza por una inflamación evidente donde incluso la piel que rodea a la boca presenta síntomas importantes de edema. Figura tomada de la referencia 2.

Las reacciones alérgicas son respuestas inmunológicas desencadenadas por la activación de un tipo particular de células, llamadas células cebadas, quienes secretan numerosos compuestos que inician y mantienen la inflamación después de una estimulación mediada por un anticuerpo específico (la inmunoglobulina E), que a su vez se encuentra unido a un alérgeno. En las próximas páginas, describiremos las características de las células cebadas y de la inmunoglobulina E (IgE), además de describir el proceso molecular que lleva a la liberación de mediadores y síntesis de compuestos que provocan los síntomas de los padecimientos alérgicos.

Las células cebadas

Las células cebadas (MC) se derivan de progenitores presentes en la médula ósea, de donde migran como precursores inmaduros a todos los tejidos vascularizados del organismo, donde terminan su diferenciación. Aunque pueden encontrarse en todos los tejidos del cuerpo humano, se localizan preferencialmente en las proximidades de los vasos sanguíneos y de las terminales nerviosas, así como en las capas inferiores de los epitelios. Estas células también se encuentran presentes en los órganos linfoides. Cuando se observan bajo el microscopio, se caracterizan por tener un núcleo grande con características de una actividad transcripcional vigorosa, sin embargo, su característica estructural distintiva es la presencia de un citoplasma lleno de gránulos de tamaño y composición variable, donde almacenan diversos mediadores como histamina, proteoglicanos, proteasas y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) (Figura 3). Diversos modelos se han implementado para el estudio de este tipo celular y los roedores constituyen uno de ellos. En los ratones, existen dos tipos de células cebadas: uno de ellos lo conforman las células cebadas que se encuentran en la mucosa que recubre el tracto intestinal (células cebadas mucosales), que son dependientes de las células T y poseen gránulos con poca histamina y mucho sulfato de condroitina. En los humanos, el grupo celular correspondiente lo constituyen las células cebadas de la mucosa intestinal y espacios alveolares del pulmón; dependen también de la presencia de células T y sus gránulos presentan tripsina pero no otras proteasas neutras. El segundo grupo de células cebadas murinas se encuentra en la piel y la serosa de diversos órganos, sus gránulos contienen heparina y grandes cantidades de histamina. A diferencia de las mucosales, las células cebadas de tejido conectivo no son dependientes de las células T. En los humanos, las células cebadas de tejido conectivo se encuentran en la piel y en la submucosa intestinal, presentando gránulos ricos en proteasas neutras como la tripsina, la quimasa, la catépsina G y la carboxipeptidasa.

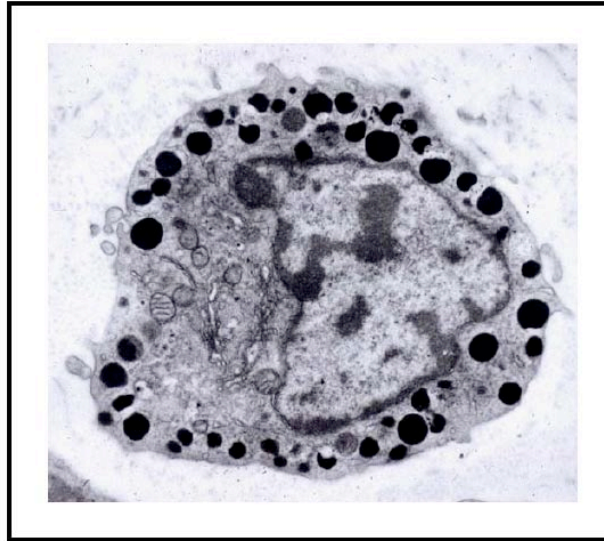


Figura 3. Las células cebadas se encuentran presentes en todos los tejidos y se caracterizan por la presencia de una multiplicidad de gránulos en su citoplasma. Estos gránulos son liberados al exterior después de un estímulo antigénico. Esta microfotografía muestra a una célula cebada de la mucosa oral humana en condiciones normales (imagen tomada de www.city.ac.uk/.../2004%20connective.htm).

Aunque el papel patofisiológico de los diversos tipos de células cebadas no se conoce por completo, su localización, contenido granular y relativa dependencia de las células T indican que cada grupo puede ser importante en diferentes procesos patológicos. Pareciera como si las células cebadas mucosales estuvieran involucradas en la hipersensibilidad mediada por las células T e IgE, como el asma bronquial, mientras que las células cebadas de tejido conectivo mediaran las reacciones de hipersensibilidad en la piel, así como en eventos vasculares similares que son inducidos por estímulos no inmunológicos en varios tejidos conectivos. Es importante notar que el fenotipo de una célula cebada no es invariable y puede cambiar en respuesta a citocinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, las células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC), pueden cambiar su fenotipo a células de tejido conectivo si se co-cultivan con fibroblastos o en presencia de un factor de crecimiento llamado stem cell factor (SCF). En ratones que carecen de células cebadas, se ha logrado demostrar que pueden reconstituírse ambos subtipos introduciendo solamente células de tejido mucosal, lo que indica que la diferenciación puede producirse en ambas direcciones.

Otra característica distintiva de las células cebadas, es que presentan en su superficie al receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (IgE), el receptor Fc ϵ RI.

Inmunoglobulina E y atopia

La IgE es el anticuerpo que contiene cadenas pesadas del tipo ϵ . Este anticuerpo circula por la sangre y está presente en una concentración menor a 1 μ g/mL. En condiciones patológicas como infecciones con helmintos y atopia (ver más adelante), este nivel puede llegar hasta 1000 μ g/mL. La regulación de la síntesis de IgE depende de la propensión de cada individuo para montar una respuesta tipo T_H2 a los agentes extraños, llamados alérgenos. Esta propensión puede ser influenciada por una gran variedad de factores, como la carga genética heredada, la naturaleza de los antígenos y la historia de exposiciones previas a los antígenos. De esta manera, los individuos atópicos heredan la tendencia a producir niveles altos de IgE y presentan riesgo a

padecer alergias, pero los factores ambientales determinan el tipo e intensidad del padecimiento. La síntesis anormalmente elevada de IgE y la presencia de atopia son características que se heredan conjuntamente. Estudios genéticos realizados en diversas familias han mostrado una transmisión autosomal clara de la atopia, aunque el patrón genético de la enfermedad sea probablemente multigénico. Diversos estudios genéticos han encontrado loci asociados con la atopia en el cromosoma 5q, cerca del sitio donde se encuentran los genes para IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, e IL-13, además de los genes para los receptores de IL-13 e IL-4. Por otro lado, polimorfismos en el promotor de la IL-9 se han asociado al asma bronquial y esta citocina produce inflamación de las vías aéreas en modelos experimentales de asma. Otro locus asociado a la aparición de la atopia está localizado en el cromosoma 11q13, donde se encuentra el gene para la subunidad β del receptor Fc ϵ RI.

Los alergen

Para que se inicie la síntesis de IgE, los agentes extraños deben encontrarse con las células presentadoras de antígenos en los diferentes epitelios. Esas células migran a los nódulos linfáticos, donde presentan los antígenos procesados a los linfocitos T y B. Distintas interacciones entre estas células inician respuestas coordinadas por citocinas (como la IL-4 e IL-13) y son moduladas por la presencia de moléculas coestimuladoras, llevando al linfocito B a la síntesis específica de IgE dirigida contra el alergen. Se ha encontrado una correlación positiva entre una respuesta tipo T_H2 y la síntesis de IgE, aunque no se sabe el porqué solamente algunos alergen

inducen preferencialmente la síntesis de ese grupo de citocinas. Una posibilidad es que los alergen

no siempre van acompañados de adyuvantes naturales y entonces no son capaces de estimular una respuesta inmune innata, que pudiera promover la activación de los macrófagos y la secreción de citocinas T_H1. Por otro lado, la capacidad de ser alergénico pudiera residir en el antígeno mismo, probablemente por la presencia de ciertos epítopes que son fácilmente identificables por ciertas células T. Aunque no se puede predecir definitivamente si una molécula será alergénica o no, existen varias propiedades comunes de muchos alergen

estas características incluyen un bajo peso molecular, glucosilación y alta solubilidad en los fluidos del organismo. Las respuestas anafilácticas a los alimentos, por ejemplo, típicamente involucran proteínas pequeñas con alto grado de glucosilación. Estos determinantes estructurales probablemente protejan a los alergen

de la desnaturalización y la degradación en el tracto intestinal, permitiendo su absorción conservando intacta su estructura. Las proteínas intactas sirven como una fuente rica de péptidos para la activación de las células T y pueden interactuar directamente con IgE. Curiosamente, muchos alergen

potentes, como la proteasa de cysteínas del ácaro casero *Dermatophagoides pteronyssinus*, o la fosfolipasa A₂ en el veneno de las abejas, son enzimas y de hecho, se han identificado enzimas como los componentes alergénicos de muchas otras sustancias asociadas con reacciones alérgicas, como polen, esporas de hongos y del latex.

Debido a que las reacciones de hipersensibilidad inmediata son dependientes de las células T, los antígenos independientes de células T como los polisacáridos no pueden inducir tales respuestas a menos que se encuentren unidos a proteínas. Algunos compuestos no-proteicos, como la penicilina, frecuentemente ocasionan respuestas muy fuertes de IgE. Estos fármacos pueden reaccionar químicamente con residuos de aminoácidos para formar conjugados acarreadores de haptenos. Tales conjugados son internalizados, procesados en péptidos y presentados a las células T, ocasionando una respuesta mediada por IgE.

La historia natural de exposición al alérgeno es un determinante importante del nivel de anticuerpos IgE en el organismo. Se requiere de la exposición repetida al alérgeno para desarrollar una reacción atópica a ese antígeno, debido a que se requiere la síntesis de la IgE específica y su unión al receptor Fc ϵ RI en la superficie de las células cebadas, antes de que cualquier reacción alérgica se presente. De esta manera, los individuos alérgicos mejoran con frecuencia cuando cambian de residencia, lejos de los granos de polen o los ácaros que ocasionaban la respuesta. Las toxinas en los venenos de insectos no son de preocuparse en el primer contacto con ellas debido a que los individuos atópicos no tienen IgEs específicas para tales antígenos, sin embargo, una segunda picadura de un insecto de la misma especie, puede producir un choque anafiláctico.

El receptor Fc ϵ RI y su sistema de transducción.

La IgE, como todos los demás anticuerpos, solo puede ser sintetizada por los linfocitos B, sin embargo, la IgE funciona de manera indirecta como un receptor para antígenos en la superficie de las células cebadas. Esta función se lleva a cabo gracias a la unión de este anticuerpo al receptor Fc ϵ RI en esas células. La constante de disociación de la IgE y el Fc ϵ RI es de 1×10^{-10} M, lo que indica que la unión entre el anticuerpo y el receptor es mucho más fuerte que las de otros anticuerpos con sus receptores. De esta manera, aunque en condiciones normales la concentración de IgE es baja en comparación con otras inmunoglobulinas ($>1 \text{ g/mL} = 5 \times 10^{-10} \text{ M}$), es lo suficientemente alta para ocupar a los receptores Fc ϵ RI, preparando a la célula cebada para responder a un estímulo antigénico. El receptor Fc ϵ RI es un heterotetrámero compuesto por una cadena α , una cadena β y dos cadenas γ unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 4).

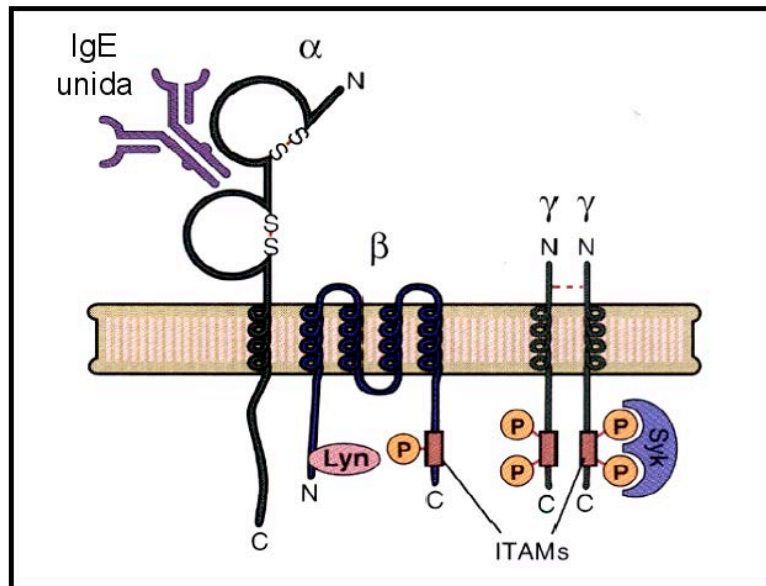


Figura 4. El receptor FcεRI es un heterotetrámero compuesto por una subunidad α , una subunidad β y dos subunidades γ unidas entre sí por puentes disulfuro. La subunidad α une a la fracción Fc de la IgE, y las subunidades β y γ poseen secuencias de activación en tirosinas, llamadas ITAMs (por sus siglas en inglés: Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs). Al activarse el receptor por medio de una dimerización, la cinasa Lyn fosforila los ITAMs de las cadenas β y γ , lo que ocasiona que la cinasa Syk se transloque a estos sitios y se active. De esta forma, se inicia la cascada de transducción de señales de este receptor.

La activación del FcεRI ocurre cuando un alérgeno favorece la agregación del receptor al formar complejos de diversos tamaños en la superficie de la célula cebada. El fenómeno de agregación desencadena una complicada serie de reacciones que culminan con (1) la secreción del contenido granular de las células cebadas, (2) la liberación de mediadores lipídicos sintetizados *de novo* y (3) la secreción de diversas citocinas que controlan las fases tardías de las respuestas alérgicas. Todas estas acciones intracelulares están mediadas por proteínas y mediadores específicos, que constituyen lo que llamamos el *sistema de transducción* del receptor FcεRI (Figura 5).

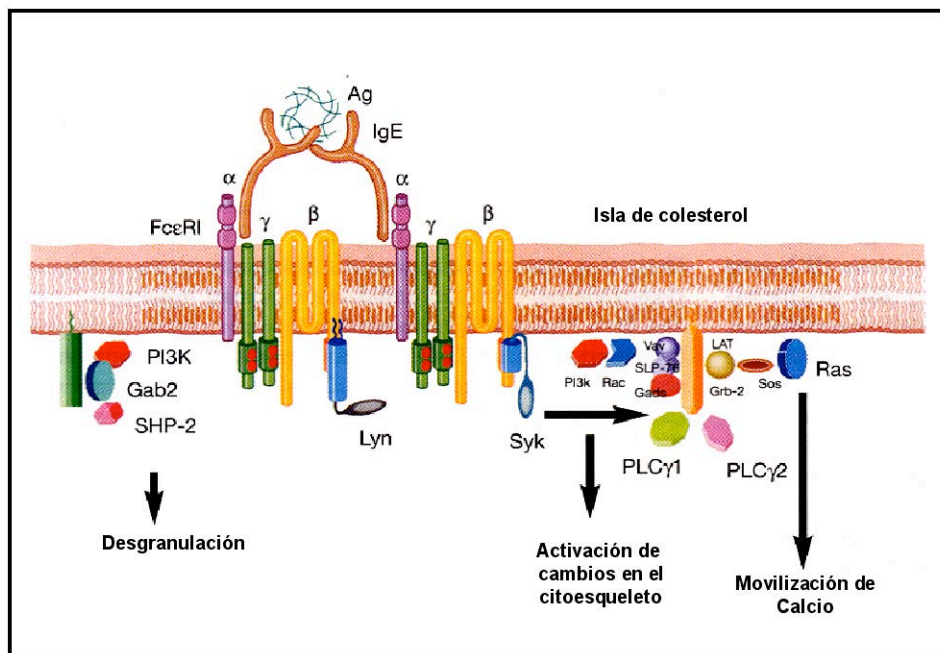


Figura 5. Proteínas membranales del sistema de transducción de señales del receptor FcεRI en una célula cebada. Ver el texto para detalles.

El entrecruzamiento inicial ocasiona la fosforilación de secuencias específicas llamadas ITAM (por las siglas en inglés de *Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif*) de las cadenas β y γ por cinasas de la familia de Src, quienes pueden ser Lyn o Fyn. Los ITAMs fosforilados reclutan a su vez a otra cinasa llamada Syk, que se une a ellos a través de sus dominios SH2 y se activa aún más por una fosforilación mediada por Lyn.

Syk cataliza la fosforilación de algunas proteínas adaptadoras, como LAT, SLP-76 y NTAL, formando un agregado multimérico que aglutina y activa a varias enzimas, como la isoforma γ de la fosfolipasa C (PLC-γ), quien regula la movilización de Ca^{2+} y la actividad de la proteína cinasa C (PKC) al hidrolizar el fosfolípido de membrana PI-4,5 P2 (fosfatidil inositol 4,5, bifosfato) para formar IP₃ (inositol trifosfato) soluble y diacilglicerol (DAG) unido a la membrana plasmática. El reclutamiento de otras proteínas, como Vav, Shc, Grb2 y Sos culmina con la activación de varias enzimas de bajo peso molecular que hidrolizan GTP (GTPasas), como Ras, Rac y Rho. Estas GTPasas modulan la activación de diversos miembros de la familia de las MAPK como ERK, JNK y p38, las cuales regulan la actividad de numerosos factores de transcripción para la producción de citocinas y la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA₂) para generar compuestos derivados del ácido araquidónico.

Otra enzima efectora muy importante en el sistema de transducción del receptor FcεRI es la PI3K (cinasa del fosfatidil inositol). La subunidad reguladora (p85) de esta enzima ocasiona su reclutamiento a los complejos formados en la membrana plasmática, lo que ocasiona que la subunidad catalítica (p110) fosforile al PI-4,5 P2 y genere un segundo mensajero fundamental, el PI-3,4,5P₃. Nuestro conocimiento de la activación de la PI3K después del entrecruzamiento del FcεRI se ha incrementado

considerablemente durante los últimos tres años. La proteína adaptadora Gab2, quien se fosforila en tirosinas rápidamente después de la agregación del receptor, puede unir a la subunidad p85 de la PI3K, ocasionando su activación. Además, recientemente se encontró que otra cinasa de la familia de Src, llamada Fyn es la cinasa responsable de la fosforilación de Gab2 (independientemente de Lyn, Syk o LAT). De manera muy similar a lo que ocurre con Lyn, Fyn se asocia con la subunidad β del receptor Fc ϵ RI en las células cebadas y esta interacción se hace más firme cuando el Fc ϵ RI se activa. Aquí cabe señalar que el reclutamiento de dos cinasas de la familia de Src al Fc ϵ RI (Lyn y Fyn), tiene una enorme similitud con los eventos tempranos que ocurren después de la activación del receptor de las células T, donde las cinasas activadas son Lck y Fyn.

Este proceso bioquímico de formación coordinada de complejos en la membrana plasmática, organizado por diversas proteínas adaptadoras fosforiladas por cinasas dependientes de la agregación del receptor, no puede concebirse separado de la participación de algunos dominios de la membrana plasmática, llamados de manera general islas de colesterol o "lipid rafts".

Aunque existe evidencia controversial acerca del papel de estos "lipid rafts" en la capacidad del receptor de transducir la señal, en ciertas células cebadas modelo es indispensable que los agregados multimoleculares se formen en esas zonas de la membrana para observar la activación celular (como la secreción del contenido granular). Los resultados indican claramente que es posible obtener un inmunoprecipitado en el cual se encuentran el receptor, LAT, VAV-1, SLP76, y PLC γ pocos segundos después de la estimulación. Por distintas técnicas de microscopía se ha observado la localización de este complejo macromolecular en zonas discretas ricas en colesterol, de la membrana de la célula cebada. Sin embargo, existen proteínas (como Gab2, PI3K y una parte de Fyn) que se encuentran excluidas de estas zonas de la membrana plasmática.

La activación de diversas moléculas en el interior de complejos membranales desencadena una serie de cambios importantes también en el grado de activación de diversas proteínas citoplásmicas, como diversas MAPK quienes a su vez, fosforilan a distintos factores de transcripción. Existe evidencia experimental que indica que las tres distintas cinasas MAP: ERK2, JNK y p38, forman parte de la cascada de amplificación de la señal del Fc ϵ RI, lo que a su vez, culmina con la translocación nuclear de varios factores de transcripción, como el NF κ B, NF-AT, ATF-2, Elk-1, SRF y AP-1. El flujo de Ca²⁺ activa a la calcineurina, una fosfatasa de serina/treonina dependiente de calcio/calmodulina, que a su vez desfosforila al factor de transcripción NF-AT y causa su translocación al núcleo celular, induciendo la transcripción de diversos genes, como el de la IL-2.

Una vez que los factores de transcripción son activados, se unen en diferentes combinaciones a las regiones promotoras de distintos genes, iniciando una respuesta transcripcional compleja que desemboca en la síntesis de por lo menos 25 citocinas diferentes, dependiendo del origen de la célula cebada estudiada. Las citocinas son sintetizadas y liberadas varias horas después de que el estímulo antigénico se presentó y de esta manera, el sistema de transducción del receptor Fc ϵ RI incluye proteínas membranales, citoplasmáticas y nucleares, las cuales, actuando de manera coordinada, regulan la expresión de genes de citocinas, quienes a su vez ocasionan inflamación y otras respuestas mediadas por células T (Figura 6). Estas citocinas son las responsables de los síntomas de la fase tardía de las respuestas alérgicas.

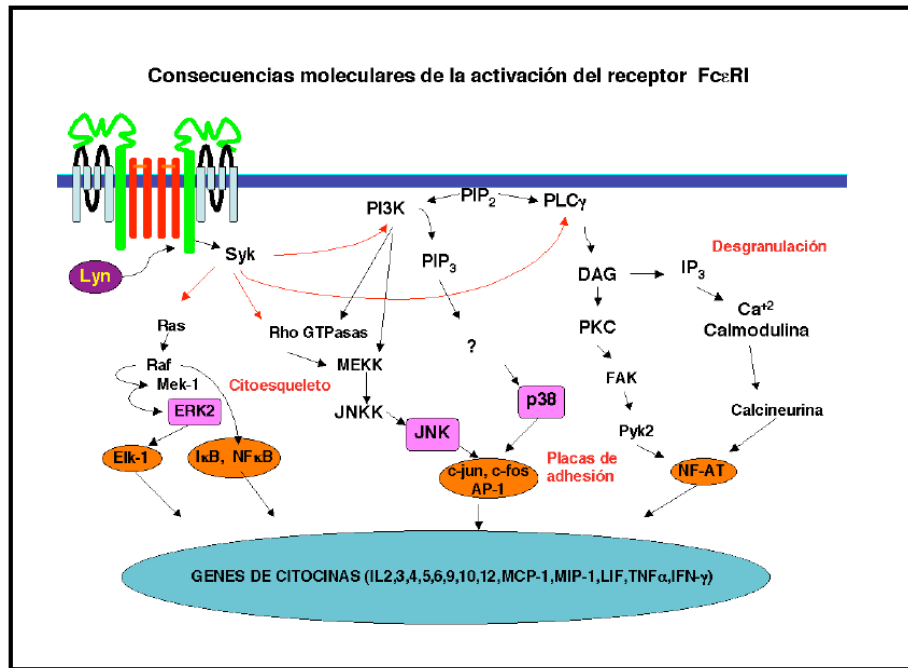


Figura 6. Proteínas citoplásmicas y nucleares que participan en la activación antigénica de las células cebadas (Ver el texto para detalles).

Blancos terapéuticos para el tratamiento de las alergias

Debido a que las enfermedades alérgicas ocasionan un importante gasto de recursos a los sistemas de salud de diversos países, las compañías farmacéuticas han invertido una cantidad enorme de dinero en la búsqueda de nuevos fármacos para este mercado internacional de grandes proporciones. Las terapias actuales para el asma y la rinitis son efectivas en la mayor parte de los pacientes, mientras que el tratamiento de la dermatitis atópica es menos efectivo. El choque anafiláctico es tratable con adrenalina, pero se necesitan terapias preventivas para los pacientes susceptibles. Se necesitan asimismo, tratamientos contra los cuadros asmáticos resistentes a los medicamentos disponibles y también se requieren medicamentos contra otros padecimientos donde la atopia es un factor desencadenante. Para las lesiones en cavidad oral, el uso de los corticosteroides locales o sistémicos ha probado ser la estrategia más eficiente, aunque las cromonas aplicadas de manera tópica (cromoglicato de sodio, nedocromil sódico, etc), han mostrado efectos muy satisfactorios sin daños colaterales. Nuevas terapias para los padecimientos alérgicos se han desarrollado mejorando los fármacos ya existentes o se han generado a partir de la investigación básica de los mecanismos de activación de las células cebadas. De esta manera, los moduladores de las actividades de citocinas (terapias anti IL-4, anti IL-13, o anti TNF), junto con los inhibidores de quimiocinas, los de factores de transcripción e inhibidores de Syk ó Lyn (picetanol y PP1, respectivamente), constituyen los nuevos blancos terapéuticos para este tipo de padecimientos.

Referencias**Lecturas Recomendadas**

1. Galli, S. J., Kalesnikoff, J. G., Grimbaldeston, M.A., et al. (2005) Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Ann. Rev. Immunol.* **23**: 749-786.
2. Sapp, Jp., Eversole, LR., y Wysocki, GP. Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea. Versión en español de Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology, 1998. Ediciones Harcourt, España. ISBN 84-8174-291-0.
3. Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling. J. Rivera, J.R. Cordero, Furumoto, Y., C. Luciano-Montalvo, C. González-Espinosa, M. Kovarova, Odom, S., Parravicini, V. *Molecular Immunology* 1143: 1-6, 2002.
4. Abbas, KA., Lichtman, A.H., Pober, JS. Cellular and Molecular Immunology, Fourth Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 2000. Capítulo19 Immediate Hypersensitivity.
5. Barnes, P.J. (1999). Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* **402** (suppl): B31-B38.

Hipertensión y Diabetes ¿Dos Historias Diferentes?

Jesús A. Olivares Reyes
Araceli Arellano Plancarte

En la actualidad, las enfermedades crónico degenerativas ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Como parte de éstas, se encuentran las que integran el síndrome metabólico o síndrome X caracterizado por: resistencia a la insulina, obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión, enfermedades cardiovasculares y dislipidemias. En estudios clínicos, epidemiológicos, prospectivos y de seguimiento se ha sugerido una asociación entre la presencia de obesidad, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina e hipertensión (Mac Mahon *et al.*, 1984; Pollare *et al.*, 1990). También se ha documentado que la hipertensión y la resistencia a la insulina son dos fenómenos que pueden coexistir de forma independiente a la obesidad (Ferranini *et al.*, 1987).

Otros estudios han demostrado que el riesgo de desarrollar DM2 es mayor en personas que tienen hipertensión y que con el tratamiento de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y con antagonistas del receptor AT₁ para la angiotensina II (Ang II) como es el caso de lirsatan, disminuye en personas hipertensas el riesgo de desarrollar DM2 (Hansson *et al.*, 1990; Yusuf *et al.*, 2001; Dahlof *et al.*, 2002). Con estos datos se hace evidente una relación entre la hipertensión y la resistencia a la insulina y/o DM2, de tal manera que la presencia de hipertensión podría ser una condición patológica que ayude al desarrollo de resistencia a la insulina y/o DM2. Sin embargo, también se han reportado datos que sugieren una relación inversa, en donde la presencia de DM2 y/o resistencia a la insulina podría influir en el desarrollo de la hipertensión. Estos riesgos aumentan aún más cuando se hace presente la obesidad.

La hipertensión es una enfermedad que por sí sola lleva al desarrollo de enfermedad cardiovascular, infarto y aterosclerosis. La DM2 por su parte también favorece el desarrollo de éstas, además de otras complicaciones como nefropatía, retinopatía y neuropatía. Debido a esto se ha sugerido que la coexistencia de estas dos entidades patológicas (DM2 e hipertensión) aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular en 1.82 veces en comparación con los diabéticos que no son hipertensos (The hypertension in diabetes study group, 1992) y 4 veces en comparación con los individuos no diabéticos hipertensos.

Debido a las implicaciones en salud pública que por sí solas tienen cada una de estas enfermedades y más aún cuando éstas se presentan como parte de una enfermedad, se hace necesario definir él o los mecanismos que participan en el desarrollo de la hipertensión y de la resistencia a la insulina e identificar las posibles vías de interacción entre las dos entidades patológicas.

1.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II

La hipertensión es una enfermedad que se caracteriza por un aumento en los niveles de presión sanguínea generados principalmente por la acción de la Ang II.

1.1.1 Sistema Renina-Angiotensina.

La Ang II es una hormona multifuncional que juega un papel importante en regular la presión sanguínea y la homeostasis cardiovascular y es generada principalmente por el sistema renina-angiotensina (RAS). RAS fue descrito como un sistema productor de Ang II (ver figura 1) a nivel sistémico, en el que la hormona renina, que es liberada por las células yuxtaglomerulares del riñón, degrada al precursor de la Ang II, el angiotensinógeno (una macroglobulina secretada por el hígado). La degradación del angiotensinógeno genera la hormona angiotensina I (Ang I), la cual por acción de la ECA es degradada a Ang II en los pulmones. La Ang II puede seguir siendo degradada por acción de endopeptidasas a un ectapéptido (Ang 1-7), así como también a Ang III y Ang IV (Dinh *et al.*, 2001).

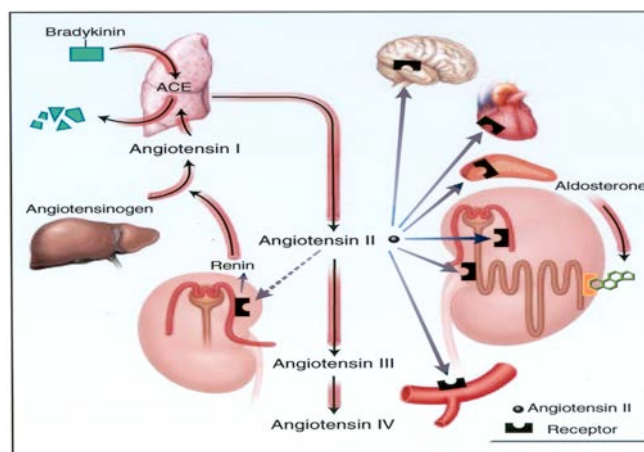


Figura 1. Vías de síntesis de la Ang II.

Además del papel que juega RAS en la síntesis de la Ang II a nivel sistémico, se ha descrito la generación de Ang II por una vía independiente a RAS. Se ha sugerido que una serina proteasa del tipo de la quimotripsina (quimasa), parece tener

un papel muy importante en la formación de la Ang II en tejido vascular humano y en la arteria carótida de perro (Hollenberg *et al.*, 1998; Shiota *et al.*, 1999). Además, hay evidencia de que la quimasa puede estar involucrada en la síntesis de Ang II en corazón y riñón de humano (Wolny *et al.*, 1997; Urata *et al.*, 1993; Hollenberg *et al.*, 1998). Otras enzimas podrían estar involucradas en la formación de la Ang II como la catepsina G, la enzima formadora de la Ang II sensible a quimostatina, el plasminógeno activador de tejido y la tonina (Urata *et al.*, 1995; Urata *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha sugerido el papel de RAS en la generación de la Ang II no solo a nivel sistémico, sino en órganos como parte de un sistema local, como son: la vasculatura, el corazón, el riñón, el cerebro, las glándulas adrenales, el hígado, los órganos reproductores y aunque *in vivo* no se ha demostrado la producción de la Ang II en tejido adiposo hay datos que demuestran la presencia de componentes de RAS en éste (Dinh *et al.*, 2001; Schiling 2002., Goossens *et al.*, 2003). RAS, como sistema local podría estar involucrado en la inducción de efectos autócrinos, parácrinos y probablemente endócrinos.

Con respecto a la presencia de RAS en tejido adiposo se ha observado que la Ang II puede tener efectos sobre el crecimiento y la diferenciación debido a la inducción de la producción de prostaglandina I₂, que sirve como un potente y específico estimulador autócrino de la diferenciación de adipocitos (Goossens *et al.*, 2003). También se ha observado que la Ang II aumenta la actividad y la velocidad de la transcripción de enzimas lipogénicas claves como son; la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la ácido graso sintetasa (Jones *et al.*, 1997).

La Ang II ejerce sus funciones a nivel celular a través de la activación principalmente del receptor AT₁.

1.1.2 Receptor AT₁

El receptor AT₁ es expresado y distribuido de manera abundante en tejidos de adulto, incluyendo la vasculatura, el corazón, el riñón, el tejido adiposo, el cerebro, el hígado, las glándulas adrenales y los pulmones. Pertenece a la familia de receptores de siete pasos transmembranales o receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Goossens *et al.*, 2003; Dinh *et al.*; 2001).

Dentro de las principales vías en las que se sabe está involucrado, es la activación de una proteína Gq heterotrímica ($\alpha\beta\gamma$). Esta proteína al ser activada por el receptor se disocia la subunidad α del dímero $\beta\gamma$ y la subunidad α activa a la fosfolipasa C β (PLC), la cual degrada fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en la membrana plasmática generando diacilglicerol (DAG) e Inositol (1,4,5) tri-fosfato (IP₃). IP₃

incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular y junto con DAG puede activar diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC), tales como α , β I, β II, γ , isoformas que se activan de manera dependiente de DAG y Ca^{2+} o bien η , ϵ , δ , θ isoformas que se activan por DAG (Mellor & Parker 1998). Además se ha documentado que activa a la fosfolipasa A_2 , la fosfolipasa D y canales de Ca^{2+} de tipo L, así como también que puede inhibir a la adenilato ciclasa mediante la activación de una proteína G_i (Goossens *et al.*, 2003). (ver figura 2).

De igual manera se ha reportado que la Ang II, a través del receptor AT_1 , puede inducir la activación de receptores de la familia para factores de crecimiento como PDGF (receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas) y EGF (receptor del factor de crecimiento epidermal) (Linseman *et al.*, 1995; Seta & Sadoshima 2003). Así como también, la activación de proteínas río abajo involucradas en vías de crecimiento como la $\text{PLC}\gamma$, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), y cinasas Janus (JAK), etc.

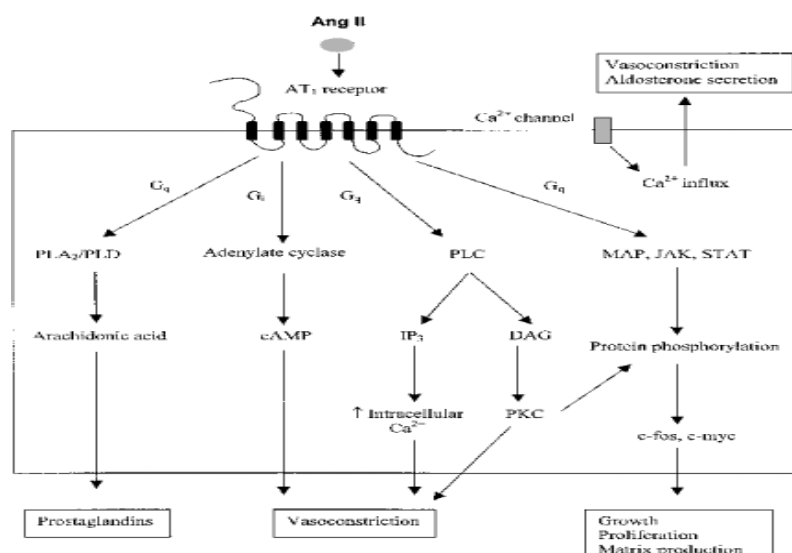


Figura 2. Vías de señalización activadas por el receptor AT_1 (Dinh *et al.*, 2001. Clin Sci. 100; 481-492)

Funciones del receptor AT_1 . La activación del receptor AT_1 en vasos sanguíneos causa vasoconstricción, llevando a un incremento en el tono vascular periférico y en la presión sanguínea. En el corazón se ha determinado que la activación de receptores AT_1 media efectos positivos inotrópicos y cronotrópicos en cardiomiocitos. También se ha determinado que la Ang II, a través del receptor AT_1 , media el crecimiento celular y la proliferación de miocitos de corazón, fibroblastos y células de músculo liso vascular y puede inducir la liberación y expresión de varios factores de crecimiento endógenos, incluyendo el factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento transformante β -

1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. Estos efectos pueden estar implicados en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y en la fisiopatología de la hipertensión. También se ha determinado que la Ang II facilita la transmisión simpática aumentando la liberación de noradrenalina de las terminales simpáticas nerviosas periféricas, así como también del sistema nervioso central (Dinh *et al.*, 2001; Goossens *et al.*, 2003). Además se le han atribuido funciones sobre el cerebro como, la modulación de la conducta de beber y de la ingestión de sal, el control central de la presión sanguínea, estimulación de la liberación de hormona pituitaria y efectos sobre el aprendizaje y la memoria.

En el riñón la Ang II esta involucrada en la regulación de la reabsorción de agua y sodio en los túbulos proximales e inhibe la secreción de renina de las células de la mácula densa ejerciendo así un control sobre la activación de RAS.

Cuando se desarrolla un estado patológico como es la hipertensión, se ven alteradas muchas de las vías de señalización en las que participa la Ang II mediante la activación del receptor AT₁.

1.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.

La insulina es la hormona anabólica más potente que se conoce (Saltiel & Pessin 2002). Después de la ingestión de alimentos es secretada al sistema circulatorio con el fin de mantener los niveles de glucosa en sangre en un rango entre 4 y 7 mM (80-120 mg/dl), a través de inducir efectos tales como, un aumento en la incorporación de glucosa en tejido muscular y en tejido adiposo e inhibición de la producción hepática de glucosa. Promueve el almacenamiento de sustratos en tejido adiposo, hígado y músculo estimulando la lipogénesis, síntesis de glucógeno y proteínas, inhibiendo la lipólisis, glucogenólisis y degradación de proteínas. Además de estos efectos sobre el metabolismo, la insulina estimula el crecimiento y la diferenciación celular (Saltiel & Kahn 2001).

En general la acción de la insulina es caracterizada por diversos efectos, incluyendo cambios en el tráfico de vesículas, la estimulación de proteínas cinasas y fosfatasas, la promoción del crecimiento celular y de la diferenciación, así como también la activación o represión de la transcripción. Esto sugiere que la insulina es una hormona que puede activar múltiples vías de señalización (Saltiel & Pessin 2002).

1.2.1 Receptor de Insulina. Generalidades.

A nivel celular, la insulina ejerce sus acciones a través de su interacción y la subsecuente activación del receptor de insulina, que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina (RTK's), que al ser estimulado por su ligando se autofosforila en residuos de tirosina (Kasuga *et al.*, 1982; Zick *et al.*, 1983).

El receptor de insulina es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen el sitio de unión a ligando, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de tirosina (Posner 2000; Perz & Torlinska 2001). En la subunidad β han sido identificadas tres regiones que incluyen dominios de unión a ATP, y sitios de autofosforilación: 1) región yuxtamembranal intracelular, que parece ser importante en la transmisión de la señal, 2) región reguladora en donde se encuentran las tirosinas 1158, 1162 y 1163 (nomenclatura según Ebina *et al.*, 1985). La autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad de cinasa del receptor, y 3) región con sitios de fosforilación en el COOH terminal que al parecer pueden jugar un papel importante regulador pero no en la señalización del receptor de insulina (White & Kahn 1994).

En condiciones de no estímulo, las subunidades α ejercen un papel regulador sobre las subunidades β , inhibiendo así la capacidad del receptor para autofosforilarse. Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de tirosina. Al parecer el mecanismo de autofosforilación se da por una trans-autofosforilación en la cual cada subunidad β fosforila en residuos de tirosina a la subunidad opuesta. Además estudios recientes han reportado que se requiere de al menos 6 sitios de fosforilación en tirosina en el receptor de insulina y la actividad enzimática de cinasa de tirosina para el apropiado funcionamiento del receptor (Posner 2000).

1.2.2 Vías de señalización de la insulina necesarias para el transporte de glucosa.

Como se mencionó anteriormente, la insulina ejerce efectos importantes en el metabolismo de nutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas. Una de sus principales funciones es aumentar la incorporación de glucosa a tejido adiposo y músculo, mediante la inducción de la translocación de transportadores de glucosa

sensibles a insulina (GLUT4) a la membrana plasmática (Saltiel & Kahn 2001). Cuando se ve alterada la incorporación de glucosa en músculo y principalmente en tejido adiposo por algún mecanismo que interfiere con la acción de la insulina, se favorece el desarrollo de DM2 y/o resistencia a la insulina.

La fosforilación en tirosina del receptor de insulina lleva al reclutamiento de proteínas que tienen dominios PTB (dominios de unión de fosfotirosinas) y dominios PH (homología a pleckstrina) tales como proteínas IRS 1-4 (sustrato del receptor de insulina), Gab-1, p60^{dok}, Cbl, APS, e isoformas de Shc (Saltiel & Pessin 2002; Saltiel & Kahn 2001; White & Kahn 1994; Czech & Corvera 1999; Bevan 2002); estas proteínas se unen al receptor y se activan por fosforilación en tirosina. Las tirosinas fosforiladas de estos sustratos actúan como sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH2, muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras como la subunidad p85 de fosfatidilinositol 3- cinasa (PI3K), Grb2, Crk II, SHP-2, etc (Virkamaki *et al.*, 1999). De estas al parecer PI3K juega un papel importante en la activación de proteínas involucradas en el transporte de glucosa (Cantley 2002; Whiteman *et al.*, 2002; Somwar *et al.*, 2001).

Como se puede ver en la figura 3, PI3K, esta formada por una subunidad reguladora (p85 α) que se une a las proteínas IRS activas a través de sus dominios SH2 y por una subunidad catalítica (p110). La activación de la subunidad catalítica induce la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato generando fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (Cantley 2002). Este lípido sirve de sitio de unión para cinasas en serina como PDK1 (cinasa dependiente de 3 fosfoinositidos), Akt y dos isoformas atípicas de PKC (ζ y λ). El reclutamiento de éstas a la membrana plasmática facilita la activación de Akt y PKC por PDK1.

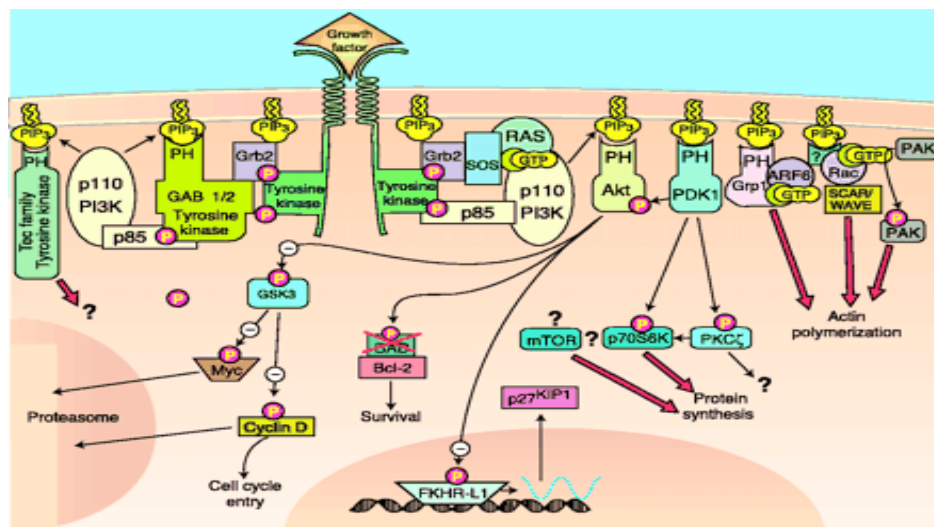


Figura 3. Vías de señalización río abajo de PI3K (Cantley. 2002. Science. 296; 1655-1657)

Como se observa en la figura 4, PDK1 puede activar a Akt, induciendo una primera fosforilación en treonina que es seguida por una fosforilación en serina, estas dos fosforilaciones son importantes para que esté la proteína completamente activa. Existen tres isoformas de Akt (Akt1, Akt2 y Akt3), de éstas, la isoforma 2 parece que es la que juega un papel importante en la incorporación de glucosa, ya que se ha demostrado que la insulina induce la asociación de Akt2 con GLUT4 (Whiteman *et al.*, 2002; Lawlor & Alessi 2001).

Por otra parte, se ha visto que Akt se encuentra involucrada en diferentes procesos dentro de los que destacan la inhibición de GSK-3 (van Weeren *et al.*, 1998), una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe la glucógeno sintetasa, la inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintetasa y el aumento en la síntesis de glucógeno. También se ha documentado que Akt puede estar involucrada en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Whiteman *et al.*, 2002; Ducluzeau *et al.*, 2002).

PDK1 también fosforila y activa a PKC ζ y a PKC λ , que al parecer juegan un papel muy importante en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Badyopadhyay *et al.*, 2002; Badyopadhyay *et al.*, 1997).

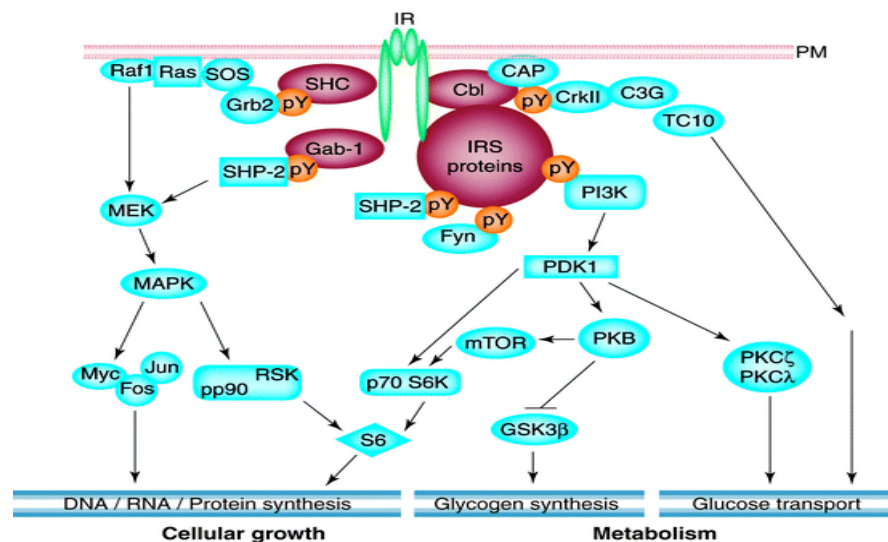


Figura 4. Transducción de señales de la Insulina (Zick. 2001. TRENDS in Cell Biology. 11; 437-441).

1.3 MECANISMOS DE REGULACION DE LA SEÑAL DE INSULINA.

Todos los procesos de señalización que se activan en la célula están sujetos a varios procesos a través de los cuales los receptores o los componentes de sus vías

de señalización son regulados con el fin de apagar la respuesta. Con relación a la vía de señalización de la insulina, se han descrito varios puntos de regulación, tanto a nivel del receptor, como a nivel de proteínas río abajo del receptor de insulina como son:

1.3.1 Receptor de Insulina.

Internalización. Una vez activado mediante la fosforilación en tirosina, el receptor de insulina experimenta una rápida internalización en complejo con la insulina a través de vesículas de clatrina y/o caveolas. El complejo insulina-receptor se localiza en los endosomas, en este sitio se ha observado que el receptor de insulina permanece activo y completamente fosforilado en tirosina por un período de tiempo significativo y que probablemente esta internalización sea necesaria para la activación de algunas vías de señalización (ver figura 5). Sin embargo, también se sabe que el proceso de internalización juega un papel importante en la degradación o reciclaje del receptor a la membrana plasmática, así como también en su inactivación por las condiciones ácidas de estas estructuras. Además de que en este lugar se lleva a cabo la degradación de la insulina por la acción de una insulinasa ácida endosomal (Posner 2000; Klein *et al.*, 1987).

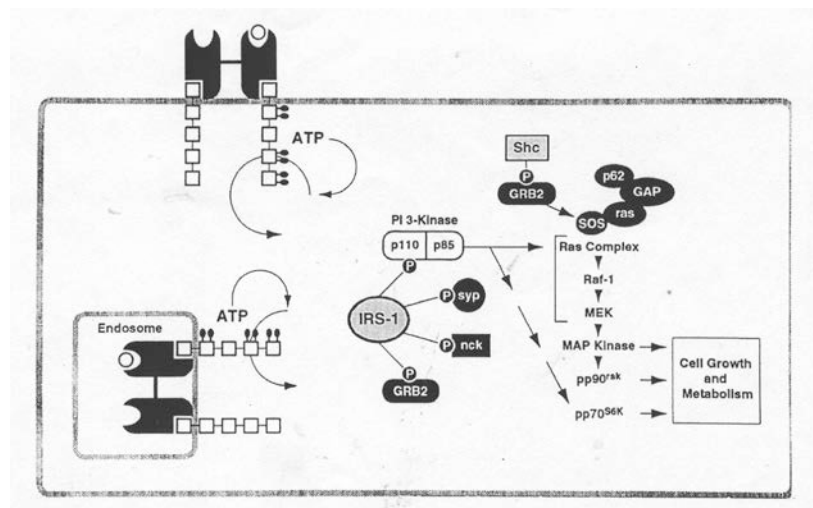


Figura 5. Mecanismos de activación e internalización de la señal de insulina (Posner. 2000. Principles of Molecular Regulation. 41-53)

Acción de PTP's. Se ha postulado que el nivel de activación del receptor esta determinado por acciones opuestas a la fosforilación del receptor. Un mecanismo de

regulación de la señal de insulina que actualmente es sujeto de un gran número de estudios, involucra la defosforilación de residuos claves de tirosina en el asa de activación del receptor. El papel de la activación de proteínas tirosina fosfatasas (PTP's) como mecanismo de inactivación del receptor de insulina ha venido tomando mucha importancia en la vía de señalización de la insulina.

En la vía de señalización de la insulina, se han descrito fosfatasas que actúan a nivel del receptor de insulina, a nivel de las proteínas IRS y fosfatasas que llevan a la defosforilación de los fosfoinosítidos 3-fosfato. Con el uso de derivados de vanadato (inhibidor, que actúa como agente que mimetiza a la insulina) (Posner 2000), se ha sugerido que la actividad de cinasa de tirosina del receptor de insulina puede ser regulada por la acción de fosfatasas de tirosina. Con relación a esto varias PTP's como son; PTP α , PTP- ϵ , LAR, PTP-1B y SHP-2 han sido implicadas como moduladoras de la acción de la insulina. El papel de la PTP-1B (proteína tirosina fosfatasa 1B) en la regulación de la señal de la insulina ha sido más estudiado, debido a la evidencia que hay de que una alteración en el gen que codifica para esta enzima, en ratones, lleva a un aumento en la sensibilidad a la insulina (Saltiel & Pessin 2002).

Por otra parte, el papel de SHP-2 como regulador negativo de la vía de señalización de la insulina es controversial, ya que, se ha encontrado que se une al receptor de insulina y a la proteína IRS-1 y que esta unión activa a la fosfatasa e inhibe a la proteína (receptor de insulina ó proteína IRS-1). Sin embargo, también existe evidencia que involucra a SHP-2 en la vía de Ras/MAP como un regulador positivo de esta (Appia-Asante & Kennedy 2003; Elchebly *et al.*, 2002).

Inhibición inducida por glucosa. Se ha reportado que elevadas concentraciones de glucosa inhiben la actividad de cinasa del receptor de insulina. En células Rat-1 transfectadas de manera transitoria con el receptor de insulina se encontró que una concentración de 25 mM de glucosa induce una disminución en la fosforilación (de aproximadamente un 34%) del receptor de insulina y de la proteína IRS-1. El mecanismo por el cual altas concentraciones de glucosa alteran la actividad de cinasa de tirosina del receptor de insulina sugiere que se induce un aumento en la fosforilación en serina y treonina del receptor de insulina y de la proteína IRS-1 mediado por PKC, esto debido a que con el uso de inhibidores de PKC se revierte el efecto inducido por la glucosa sobre la actividad del receptor (Pillay *et al.*, 1996).

Fosforilación en residuos de serina/treonina. La fosforilación en residuos de serina/treoninas ocurre en respuesta a la insulina. Esta fosforilación parece jugar un papel importante en la modulación de la función del receptor de insulina. Se ha documentado que entre las cinasas que participan en la fosforilación del receptor de

insulina en residuos de serinas/treoninas se encuentran PKA (proteína cinasa A) y PKC (Takayama *et al.*, 1984; Lewis *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1990; Miele *et al.*, 1995).

1.3.2 IRS.

Fosforilación en residuos de serina/treonina. Además de algunos mecanismos reguladores que se activan a nivel del receptor de insulina, mecanismos de regulación a nivel de proteínas río abajo del receptor también han sido determinados. Estos incluyen la regulación a nivel de proteínas IRS, principalmente por un aumento en la fosforilación de residuos de serina y treoninas (Sykiotis & Papavassiliou 2001). Algunas cinasas involucradas en este proceso incluyen GSK-3 (Finkelman & Krebs 1997), PKC ζ (Rivichandran *et al.*, 2001), PI3K (Li *et al.*, 1999) y Akt (Lawlor & Alessi 2001). Aunque el papel de Akt como regulador negativo de la activación de proteínas IRS es controversial, ya que se ha sugerido que la fosforilación de Akt tiene un papel regulador positivo sobre las proteínas IRS (Whiteman *et al.*, 2002).

El desacople de las proteínas IRS del receptor de insulina parece ser debido a 1) un aumento en la fosforilación en serina de IRS-1 e IRS-2, la cual inhibe su unión a la región yuxtamembranal del receptor de insulina activo, alterando la capacidad de las proteínas IRS de experimentar fosforilación en tirosina, 2) la fosforilación específica de residuos de serinas y treoninas adyacentes al motivo de unión a proteínas con dominios SH2 la cual disminuye la afinidad de unión de proteínas río abajo del receptor como PI3K y 3) la fosforilación en residuos de serinas y treoninas que induce la degradación de IRS (Pirola *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 2003).

Modulación por interacción con proteínas SOCS. Recientemente se ha demostrado que la familia de proteínas SOCS juega un papel importante en la regulación de la activación de IRS, ya sea por interacciones directas o indirectas. Se ha demostrado que su expresión es inducida por el tratamiento con la insulina en varios tejidos y líneas celulares. Su acción sobre la vía de señalización de la insulina ha sido mejor evidenciada a nivel de proteínas IRS, aunque se ha documentado que también podrían regular la vía de señalización a nivel del receptor de insulina. Se han descrito tres mecanismos de inhibición sobre proteínas IRS a nivel de la fosforilación en tirosina; 1) a través de la inhibición de la actividad de JAK, 2) mediante la inhibición de la unión de IRS al receptor de insulina vía competición por sitios de unión con el receptor de insulina, y 3) mediante la inducción de la degradación proteosomal de IRS (Johnston *et al.*, 2003).

1.3.3 Mecanismos de regulación río abajo de IRS.

Las fosfatasas de lípidos que defosforilan los productos de la activación de PI3K están involucradas en la regulación de la vía de insulina río abajo de IRS. Entre las que se encuentran SHIP2 una fosfatasa que induce la defosforilación del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato generando fosfatidilinositol 3,4 bifosfato; PTEN es otra fosfatasa de lípidos que defosforila en la posición 3' del fosfatidilinositol trifosfato generando fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Al parecer, estas defosforilaciones sobre los lípidos de membrana tienen efectos biológicos diferentes. Por ejemplo, parece ser que PTEN funciona como supresor de tumores ya que se ha observado que mutaciones en esta enzima llevan a síndromes neoplásicos sin tener efectos metabólicos. Sin embargo, el ratón knockout de SHIP2 muestra aumento en la sensibilidad a la insulina debido a un incremento en la producción de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato y por lo tanto a un aumento en la actividad de proteínas río abajo de PI3K involucradas en procesos relacionados con el transporte de glucosa. (Roith *et al.*, 2003).

1.3.4 Mecanismos que inducen resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de la célula para responder a la acción de la insulina. Es generada, principalmente, por la obesidad y se ha asociado con el desarrollo de DM2 (Sykiotis & Papavassiliou 2001), se caracteriza por defectos a varios niveles como; 1) una disminución en la concentración del receptor de insulina y en su actividad de cinasa de tirosina, 2) una disminución en la concentración y en la fosforilación así, como un aumento en la fosforilación en serina de proteínas IRS, y 3) alteraciones en la actividad de la PI3K, Akt y del transporte de glucosa (Saltiel & Kahn 2001).

Uno de los mecanismos que han sido relacionados con la inducción de resistencia a la insulina es un aumento en la fosforilación en residuos de serina y treonina, principalmente a nivel de proteínas IRS. En la fosforilación en serina a nivel de proteínas IRS se ha descrito el papel del factor de necrosis tumoral α (citoquina), el cual puede aumentar la fosforilación mediante varios mecanismos como es, la activación de PKC ζ , (a través de la activación de una esfingomielinasa y la subsecuente producción de ceramida la cual estimula la actividad de esta isoforma de PKC) (Zick 2001). Un aumento en la producción de ácidos grasos libres también ha sido relacionado con un aumento en la fosforilación en serina de las proteínas IRS. En tejido adiposo se ha encontrado una concentración aumentada de ácidos grasos libres y se ha sugerido que este fenómeno puede contribuir a un estado de resistencia a la insulina, inhibiendo la incorporación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la oxidación de glucosa (Saltiel & Kahn 2001; Virkamaki *et al.*, 1999). (ver figura 6)

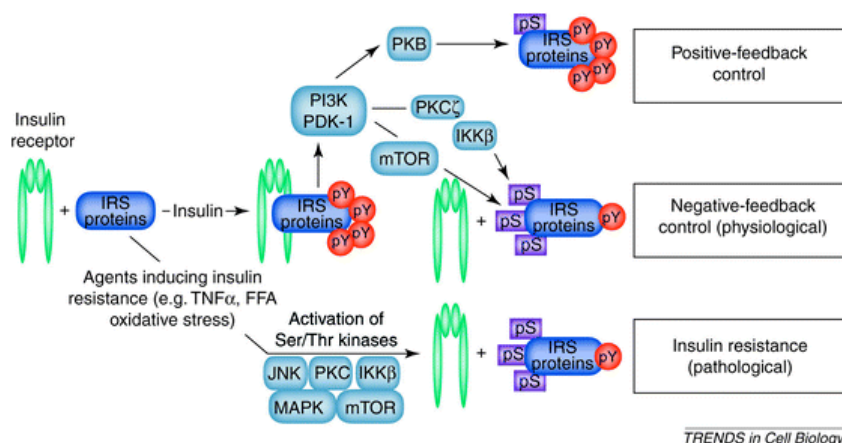


Figura 6. Fosforilación en serina y treonina como mecanismo de regulación de la vía de insulina y como inductores de la resistencia a la insulina. (Virkamaki *et al.*, 1999. J Clin Inv. 103; 931-943)

Con relación a esto, se ha demostrado que el tejido adiposo juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Además, se ha encontrado que en pacientes obesos, la expresión de IRS-1 disminuye alrededor de 54%. También se ha observado que existe down regulación (inducción en la disminución) de la expresión de la subunidad reguladora p85 α de PI3K (Virkamaki *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha reportado en estudios realizados en pacientes, a través de ensayos de micro diálisis en tejido adiposo subcutáneo femoral, que además de los efectos descritos de la Ang II sobre tejido adiposo mencionados anteriormente, ésta puede disminuir el flujo sanguíneo, la lipólisis y la incorporación de glucosa (Boshman *et al.*, 2001).

En este sentido se hace evidente el papel del tejido adiposo en el desarrollo de la resistencia a la insulina y otras enfermedades como la hipertensión. Para el desarrollo de estudios en adipocitos existen cultivos primarios de rata, de ratón, de conejo, de puerco y de humano, además también existen líneas celulares, principalmente de fibroblastos, que tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos como son; células ES, CH10T1/2, TA, 3T3-F442A, Ob17 y 3T3-L1 (Gregoire *et al.*, 1998). De éstas, la línea celular que más se ha utilizado por sus características de diferenciación, que son semejantes a la de adipocitos de humano, es la línea 3T3-L1. Además de ser el modelo mejor caracterizado en los estudios de conversión de preadipocitos a adipocitos (Ntambi & Kim 2000). Así mismo, este modelo celular ha sido muy utilizado en el estudio de diferentes procesos que tienen que ver con la vía de señalización de la insulina por la característica que tiene de contar con todos los elementos endógenos de la vía de señalización de la insulina (Tsuru *et al.*, 2002;

Frevert & Kahn 1996; Liu *et al.*, 2002; Chlang *et al.*, 2001; Holman *et al.*, 2001). Por otra parte, en este modelo celular también se ha estudiado el papel de hormonas tales como la Ang II sobre el metabolismo de los lípidos, además de que se han caracterizado el tipo de receptores para la Ang II presentes en este modelo celular (Jones *et al.*, 1997; Mallow *et al.*, 2000; Rorad *et al.*, 1995). Sin embargo, en este modelo celular no se han estudiado el efecto que podría existir en la regulación entre vías de señalización, tal es el caso de la Ang II y la insulina.

2. REGULACION DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA POR LA ANG II.

Se ha estudiado mucho con relación a los mecanismos por los cuales las vías de señalización activadas por receptores diferentes, ya sean de la misma familia o pertenecientes a otra familia, pueden regularse entre ellas (comunicación cruzada) activando o inhibiendo sus efectos. De esta manera, se ha observado que GPCR's pueden modular de manera positiva o negativa la vía de señalización inducida por la insulina, así como también las vías activadas por otros receptores que pertenecen a la familia de RTK's. De igual forma, se ha observado que RTK's pueden modular las vías de señalización activadas por GPCR's (Hurley *et al.*, 2003). Con relación a esto, se ha estudiado el efecto de la morfina a través del receptor μ -opioide sobre la vía de señalización de la insulina. En un estudio realizado por Li y colaboradores (2003), se encontró que la activación de este receptor es capaz de inhibir la activación de la vía de señalización de la insulina, induciendo un aumento en la fosforilación en serina del receptor de insulina que altera la formación del complejo Shc-Grb2. También se encontró un aumento en la fosforilación en serina 612 (inducida por PKC) de IRS, que altera la formación del complejo IRS-p85 α (subunidad reguladora de PI3K), afectando así la vía de MAPK y de Akt activada por la insulina.

Sin embargo, también se ha reportado que la insulina puede inhibir vías de señalización activadas por GPCR's, tal es el caso del receptor 5-HT_{2c} para serotonina. En células del plexo coroideo se encontró que el estímulo de éstas con insulina disminuye la liberación de Ca²⁺ inducida por serotonina. (Hurley *et al.*, 2003)

Con respecto al efecto de la Ang II sobre la regulación de RTK's, la Ang II parece ejercer un efecto activador sobre la vía de señalización de EGFR favoreciendo la fosforilación en tirosina de EGFR y la formación del complejo Shc/Grb-2, así como la activación de la vía de Ras-Raf-Mek-ERK 1/2 a lo que se le ha denominado mecanismo de transactivación. Recientemente, ha sido reportado que la fosforilación de la tirosina 319 en el motivo conservado YIPP, del extremo carboxilo terminal, del receptor AT₁ juega un papel esencial en mediar esta transactivación (Seta &

Sadoshima 2003). Parece ser que la Ang II también tiene un efecto transactivador sobre PDGFR (Linseman *et al.*, 1995).

Como ya se mencionó, estudios clínicos han reportado el posible papel de la hipertensión en el desarrollo de la resistencia a la insulina. En estudios realizados en modelos celulares o con cultivos primarios, en donde se ha intentado determinar los posibles mecanismos de acción de la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina, los resultados han sido controversiales y en algunos casos contradictorios en el mismo modelo celular (Alli *et al.*, 1997; Folli *et al.*, 1999; Carvalheira *et al.*, 2003; Ogihara *et al.*, 2001; Velloso *et al.*, 1996; Folli *et al.*, 1997; Motley *et al.*, 2003). Sin embargo, hay más evidencias que apoyan un papel regulador negativo de la Ang II sobre las acciones metabólicas inducidas por la insulina y no se ha encontrado efecto sobre la activación de la vía de las MAPK's. La vía de señalización de la insulina parece estar sujeta a un mecanismo de regulación por la Ang II diferente al que se ha encontrado para otros receptores que pertenecen a la familia de RTK's, como es el caso de EGFR y PDGFR.

Con relación a esto, en diferentes modelos celulares (células de músculo liso vascular, VSMC, células de músculo liso de aorta de rata, RASMC, cultivos primarios de células de corazón de rata, tejido cardiaco de ratas Zucker obesas y no obesas y células de ventrículo izquierdo de corazón de rata) se ha documentado que la Ang II induce la fosforilación en tirosina del IRS-1, (Alli *et al.*, 1997; Folli *et al.*, 1999; Carvalheira *et al.*, 2003; Ogihara *et al.*, 2001; Velloso *et al.*, 1996; Folli *et al.*, 1997) la cual al parecer no afectar la unión de PI3K a IRS pero si afecta su actividad (Carvalheira *et al.*, 2003; Ogihara *et al.*, 2003). También se ha estudiado el papel de la Ang II en la activación de IRS sin evaluar el efecto de esta río abajo de IRS (Folli *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2001).

Además, en VSMC se estudió el efecto de la Ang II sobre la activación de Akt y se observó que la Ang II induce una disminución en la activación de Akt de una manera dependiente a la concentración. También se estudio el efecto del tratamiento con TPA (un ester de forbol que se utiliza como activador de diferentes isoformas de PKC) y la inhibición de PKC, con lo que se encontró que PKC induce una disminución en la activación de Akt. Utilizando un sistema de sobre expresión adenoviral de PKC, se observó que PKC α , pero no otra disminuye la activación de Akt (Motley *et al.*, 2003). Por el contrario, en un estudio realizado en células RASMC se observó que la Ang II, induce una inhibición del 50% en la fosforilación en tirosina del IRS-1, disminución en la actividad de PI3K asociada a IRS-1 en un 60% y no tuvo efecto en la fosforilación del receptor de insulina, lo que sugiere que en este tipo celular la Ang II

disminuye la vía de señalización de la insulina a nivel de proteínas las IRS (Du *et al.*, 1996). También se ha reportado que en ratas alimentadas con dietas altas en sal (en donde se induce un aumento en la presión sistólica), la fosforilación de IRS-1 e IRS-2, en residuos de tirosina, y la actividad de PI3K están aumentadas. Sin embargo se presenta una disminución en la incorporación de glucosa (Ogihara *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha observado que el efecto de la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina es diferencial sobre el metabolismo y la vía de activación de MAPK. En un estudio reciente se evaluó el efecto de la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina a nivel de la PI3K y a nivel de la activación de MAPK en tejido cardíaco de ratas Zucker obesas y no obesas. Se observó que la Ang II induce la fosforilación de la cinasa 2 Janus y su asociación con IRS-1 y 2, así como un aumento en la fosforilación en tirosina de IRS y su asociación con Grb2. El tratamiento simultáneo con la Ang II e insulina aumentó esta asociación, llevando a un incremento en la fosforilación de MAPK. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de este tratamiento sobre la actividad de PI3K asociada a IRS se observó una disminución de esta (Carvalho *et al.*, 2003).

Como se puede observar, los datos presentados anteriormente han sido generados en células relacionadas con el sistema vascular, en donde la tendencia del efecto de la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina es hacia la disminución de la actividad de la PI3K asociada a IRS regulando así de manera negativa la vía de señalización de insulina, pero a través de la activación de proteínas IRS-1. El mecanismo por el cual sucede esto no está descrito. Por otra parte, el efecto de la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina en tejido adiposo no ha sido bien estudiado, a pesar de la evidencia que existe en relación con la asociación entre hipertensión-resistencia a la insulina-obesidad.

CONCLUSIONES

El papel que juega la Ang II sobre la vía de señalización de la insulina ha sido descrito en modelos celulares relacionados con el sistema vascular, en donde se ha encontrado que la Ang II induce una disminución en la actividad de PI3K asociada a proteínas IRS y que esto no se da por una alteración en la activación del receptor de insulina. Sin embargo, en otros modelos celulares relacionados con el desarrollo de la hipertensión y de la resistencia a la insulina, como tejido adiposo, no se ha estudiado el efecto que podría tener la Ang II sobre la vía de señalización de insulina involucrada en la incorporación de glucosa. Por otra parte, hay datos que demuestran que la Ang II es capaz de actuar a nivel del propio receptor en receptores pertenecientes a la familia

de RTK's, por lo que consideramos que la Ang II en adipocitos 3T3-L1 podría ejercer algún efecto sobre la vía de señalización de insulina a nivel del propio receptor. Y debido a que se ha descrito que PKC puede tener un papel importante en la regulación de la vía de insulina, creemos que sí la Ang II tiene algún efecto regulador sobre la vía de la insulina éste podría estar mediado por la activación de PKC.

BIOLOGIA MOLECULAR DE LA FORMACIÓN DE BIOCAPAS BACTERIANAS.

Dra. Tecilli Cabellos-Avelar
Dr. Jorge Membrillo-Hernández

¿Qué es un biofilm o biocapa bacteriana?

Desde los inicios de la microbiología se estudia a los microorganismos aislados de su ambiente natural en cultivos puros y en su mayoría de una sola especie. A través de los años y de observar las formas de vida de los microorganismos el estudio de éstos ha cambiado. En las últimas décadas la concepción del estudio de cultivos puros se ha dejado atrás y se ha introducido el concepto de biocapa bacteriana o biofilm que es una comunidad adherida a una superficie sea biótica o abiótica embebida en una matriz de polisacáridos que la propia comunidad secreta (6). Estas comunidades son altamente estructuradas y espacialmente organizadas y pueden estar formados por bacterias u hongos o una combinación de ambos y pueden llegar a desarrollarse desde una capa fina, hasta gruesos complejos de microorganismos (17, 18).

Importancia de la biocapa bacteriana.

Los biofilms son ubicuos, ya que colonizan diversos hábitats e interactúan con plantas, animales y con el ser humano. Estas interacciones pueden ser benéficas o pueden causar efectos dañinos. Por ejemplo los biofilms juegan un papel muy importante en la degradación de compuestos orgánicos, participan en los ciclos biogeoquímicos y se les utiliza para procesos de biorremediación de suelos y aguas, en la industria se les utiliza para generar compuestos de importancia económica (fermentadores). Pero también los biofilms causan problemas médicos al ser humano como por ejemplo en las infecciones bacterianas crónicas, como periodontitis, otitis media, infecciones del tracto biliar y endocarditis. Los biofilms siendo una asociación que está ampliamente comunicada y sincronizada metabólicamente es difícil de erradicar en el pulmón de pacientes con fibrosis quística ya que es marcadamente menos susceptible a los antibióticos siendo hasta 1000 veces más resistente (9, 22).

Fases de la formación de biofilm.

En la naturaleza los biofilms están compuestos por múltiples especies, pero para su estudio en laboratorio se han analizado principalmente de una sola especie. Estudios de la genética molecular de estos biofilms, han producido un modelo general de la formación y disgregación de la biocapa bacteriana. En este modelo, el proceso de la regulación de la formación de biofilm en especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* consta de cuatro etapas principales: 1) transporte de la bacteria en estadios planctónico o de vida libre por medio del movimiento a través de flagelos y otras estructuras involucradas en motilidad; 2) adherencia a una superficie formando microcolonias agregadas por medio de fimbrias y curlis 3) formación de una estructura madura del biofilm que adopta diferentes formas y tipos dependiendo de la especie bacteriana que se estudie donde se secreta una matriz extracelular formada principalmente de exopolisacáridos, agua, proteínas, ADN, ARN y iones que mantiene la integridad estructural, química y fisiológica de la comunidad y como etapa final, 4) la disgregación del biofilm (10, 19, 22, 27) (Fig. 1.). En todas las etapas de la estructuración del biofilm se ven influenciadas por diferentes señales provenientes del ambiente (pH, CO₂, O₂, temperatura, naturaleza de la superficie, humedad, disponibilidad de nutrientes) , así como de las células bacterianas que lo conforman (fenotipo, genotipo, interacciones ecológicas) (11, 26). Dentro de esta estructura se crea un ambiente que mantiene la homeostasis y optimiza la utilización de los recursos, creando un microambiente heterogéneo (27). Estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura del biofilm no es una masa sólida sino que presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta en zonas mas profundas del biofilm.

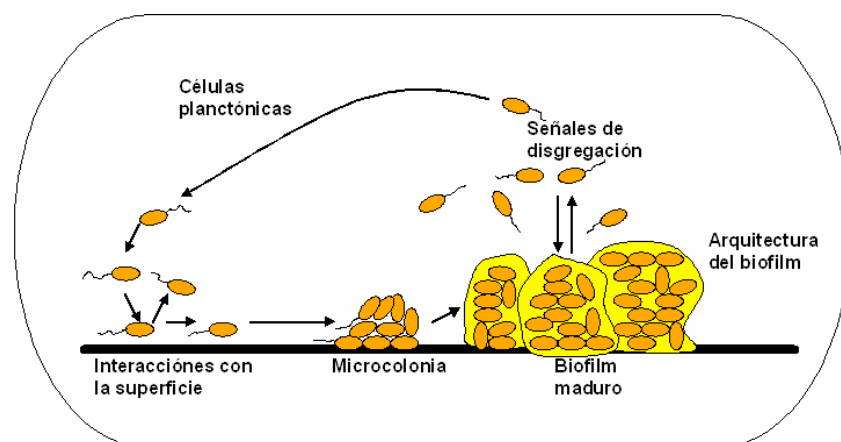


Figura 1. Puntos de control de la expresión genética en el modelo general de las etapas de desarrollo de las biocapas bacterianas.

Importancia en la Biología Oral.

Como ya se menciono los biofilms se encuentran en diversos ambientes, en el humano los biofilms se encuentran dentro de la cavidad oral. En la caracterización de esta comunidad se han identificado de 300 a 500 especies bacterianas estables, incluyendo además el género protozoa, a las levaduras, a los micoplasmas y a los virus (2, 21) de las cuales alrededor del 50% son no cultivables. Los microorganismos orales son parte importante en la salud y la enfermedad ya que contribuyen al desarrollo del sistema inmunológico y proveen de resistencia a la colonización por microorganismos patógenos. Además constituyen un reservorio potencialmente patogénico. Las bacterias normales o indígenas de la cavidad oral son los lactobacilos, estreptococos, estafilococos, enterococos, *Veillonellae*, *Neisseriae* y coliformes (12, 13, 14).

Dentro de esta comunidad existe una gran trama de vías de señalización muy importante que mantiene la integridad del biofilm. Se sabe que hay un reconocimiento célula-célula (co-agregación y co-adhesión) y se llevan acabo diversas actividades como el intercambio de metabolitos y/o genético. Por eso el estudio de los microorganismos que habitan la cavidad oral ha revelado las bases de la comunicación que existe entre las diversas especies que lo conforman (12, 13).

Placa dental

La placa dental o biofilm oral es una comunidad diversa de microorganismos que se encuentra adherida a los dientes y esta embebida por una matriz de polímeros de origen bacteriano, donde la saliva es la suspensión para las células planctónicas (23). La formación de la placa dental involucra la interacción entre una película de glicoproteínas de la superficie del diente que facilita adherencia de los colonizadores tempranos. Después por interacciones moleculares específicas se co-agregan los colonizadores secundarios a los primarios. En estas asociaciones se ven involucradas las interacciones proteína-proteína o carbohidrato-proteína (lecitinas), que contribuyen a determinar un patrón de adhesión sucesiva de bacterias (Fig. 2). La placa dental se desarrolla naturalmente, pero además esta asociada a enfermedades persistentes como la caries y de las de tipo periodontales. Futuras investigaciones se enfocan en el control de la placa interfiriendo con su establecimiento, estructura y desarrollo de esta comunidad compleja (15).

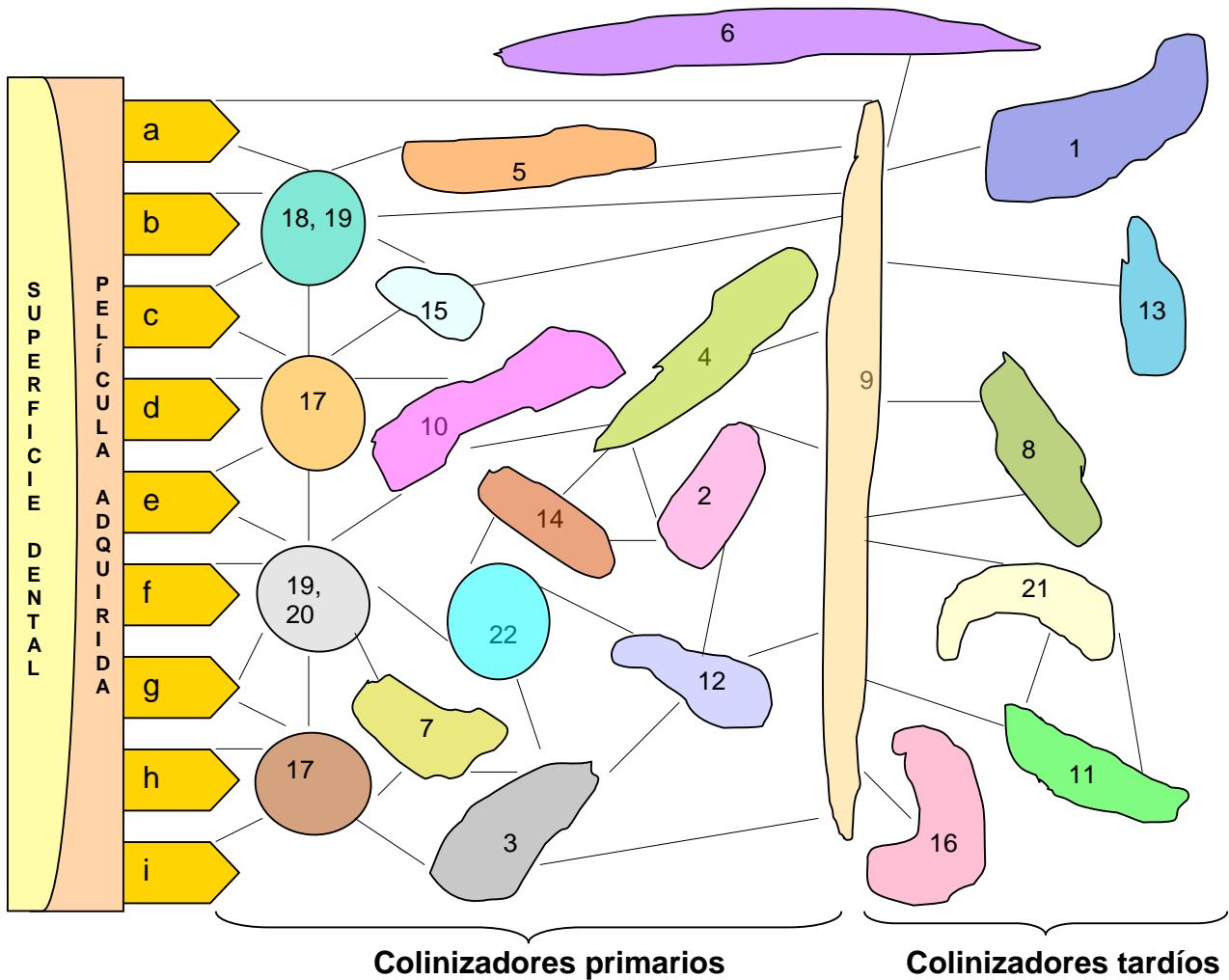


Figura 2. La placa dentobacteriana como comunidad. Proteínas de adhesión. a) estaterina, b) mucina sialilada, c) proteína rica en prolina, d) aglutinina salival, e) fragmentos de pared celular bacteriana, f) mucina sialilada, g) aglutinina salival, h) alfa amilasas, i) proteína rica en prolina. Colonizadores de la placa dentobacteriana. 1) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 2) *Actinomyces israelii*, 3) *Actinomyces naeslundii*, 4) *Capnocytophaga gingivalis*, 5) *Capnocytophaga ochracea*, 6) *Capnocytophaga sputigena*, 7) *Eikenella corrodens*, 8) *Eubacterium* spp. 9) *Fusobacterium nucleatum*, 10) *Haemophilus parainfluenzae*, 11) *Porphyromonas gingivalis*, 12) *Prevotella denticola*, 13) *Prevotella intermedia*, 14) *Prevotella loescheii*, 15) *Propionibacterium acnes*, 16) *Selenomonas flueggei*, 17) *Streptococcus gordonii*, 18) *Streptococcus mitis*, 19) *Streptococcus oralis*, 20) *Streptococcus sanguis*, 21) *Treponema* spp., 22) *Veillonella atypica*.

Hay evidencia de las interacciones físicas, metabólicas y moleculares que ocurren dentro de los microorganismos que conforman el biofilm. Las áreas de estudio principales de las bacterias orales es la descripción de señales de reconocimiento célula-célula y como estas participan en el desarrollo del biofilm. Además de la identificación molecular de los microorganismos que habitan la cavidad oral y un análisis de arreglo espacio temporal de las especies y la identificación de genes que participan en la formación del biofilm.

Para la identificación de los genes que participan en la transición de la fase planctónica a biofilm y los que se expresan dentro del biofilm se ha recurrido a una metodología conocida como tinción por cristal violeta donde se puede analizar una colección de mutantes en pozos de placas de microtitulación que puedan formar un biofilm en la fase aire-liquido, en las paredes y/o en el fondo del pozo (8, 19, 20). Mediante esta metodología ampliamente utilizada han logrado identificar los genes involucrados en las fases de formación del biofilm. También el estudio de los biofilms se ha logrado mediante la aplicación de diversas técnicas como la microscopia confocal, (utilizando marcadores fluorescentes como la proteína verde fluorescente), el análisis de imágenes por medio de programas computacionales, la comparación de genomas ya publicados, la transcriptoma, la proteomica, el desarrollo de herramientas moleculares como los sistemas reporteros para determinar la actividad genética *in situ*, la caracterización de biofilm mixtos por medio del amplificación y secuenciación del ADN ribosomal 16S y la hibridación *in situ* FISH (1, 24).

Por medio del análisis de los microarreglos que comparan las diferencias en la expresión genética de dos condiciones metabólicas diferentes como el estado de formación de biofilm y el estado en células planctónicas de *E. coli* (25), han identificado genes cuya transcripción es inducida y que están involucrados en la adherencia (fimbria tipo 1) y en la autoagregación (antígeno 43). También han identificado un cambio en la expresión génica en la transición del estado planctónico al estado en biofilm donde observaron que se inducen los genes relacionados con la limitación de oxígeno, proteínas de transporte (1, 24). En un estudio de la expresión diferencial de proteínas (proteomica) de *E. coli* 0157:H7 del estado planctónico contra el estado de biofilm reveló que la cantidad de 44 proteínas es mayor y que la cantidad de 3 proteínas es menor las cuales fueron identificadas por medio de espectrometría de masas (MALDITOF) y las clasificaron en cuatro categorías funcionales: (1) las proteínas del metabolismo general (malato deshidrogenasas, tiamin fosfatasas, pirifosforilasas, (2) las proteínas transportadoras de aminoácidos (D-ribosas periplasmicas, D-galactosas), (3) las proteínas regulatorias (metabolismo ADN) y (4)

las proteínas con funciones no asignadas. Aunque existe una variación considerable entre los resultados de cada ensayo, estos estudios han demostrado que existe hasta un 30% de expresión diferencial de los genes (28). Cabe mencionar que hay un amplio campo de estudio para descifrar el papel de los genes que aun no tienen una función designada.

Bioquímica del biofilm

Dentro de los biofilms se desarrolla un sistema sofisticado de comunicación célula-célula que coordina la expresión genética. Las bacterias Gram-positivas se comunican generalmente por la difusión de péptido pequeños modificados que son secretados al medio y se acumulan en alta densidad celular. Estos péptidos (molécula autoinductora) son reconocidos por un sistema de transducción de dos componentes conformado por una proteína sensor kinasa que interactúa con un regulador de la respuesta citoplasmático (segundo componente) en donde se detectan las fluctuaciones en la concentración de las señales y el mensaje es enviado al interior de la célula mediante el mecanismo de fosforilación/desfosforilación (7, 29).

Mientras que las bacterias Gram-negativas se comunican generalmente por la secreción de acil homoserinas lactonas (AHL) que difieren en su estructura dependiendo de la especie bacteriana que se estudie. Las AHL están involucradas en el fenómeno denominado “quorum sensing” que es un mecanismo de señalización intracelular e intercelular. El quórum sensing confiere a los microorganismos la habilidad de percibir y responder a la densidad poblacional, por medio de sensor una concentración dada de moléculas señal (autoinductor) la cual fue secretada al medio externo. Los procesos fisiológicos que se regulan por el quórum sensing son extremadamente diversos, desde el control de la bioluminiscencia, virulencia, resistencia a antibióticos, y en el establecimiento, mantenimiento y dispersión del biofilm (7, 29). Cabe señalar que el quórum sensing en *P. aeruginosa* es modulado por dos sistemas el *las/lasR* y el *rhlR/rhl* donde el sistema *las* regula positivamente al *rhl* lo que indica que hay una amplia gama de regulación de la respuesta al entorno inter o extra celular, y que estos participan en la regulación de la formación del biofilm de *P. aeruginosa*. Otros estudios han revelado que existen moléculas que inhiben esta comunicación bacteriana como las furanonas de extractos de algas o frutos. Es importante señalar que esta inhibición es de importancia médica ya que se podría desestabilizar al biofilm e erradicarlos algunas de las infecciones causadas por patógenos del humano.

En la placa dental hay un sinergismo y un antagonismo que es indicativo de la comunicación que existe dentro de esta comunidad. *Streptococcus mutans* hace uso de la difusión de peptidos que induce la formación del biofilm activando la vía de señalización de los genes *comC*, *comD*, *comE* y *comX* los cuales participan en la arquitectura del biofilm (16). Otro tipo de comunicación es el que emplea al gene *luxS* que codifica para el auto-inductor AI-2. Las mutantes *luxS* son incapaces de formar biofilm en cultivos monoespecie (13) *in vitro*, pero que en asociación con otro organismo se revierte el fenotipo y estas mutantes son capaces de formar un biofilm. También el establecimiento de estos complejos en la cavidad oral ha demostrado que existe una relación-interacción con las células del huésped (humano) donde se da una transición de comunidad comensal a patógena generando las diversas enfermedades bucales.

Perspectivas y trabajo en nuestro laboratorio.

Para entender la biología de las biocapas bacterianas se recurre al uso de diversas herramientas de la biología molecular, como han sido la obtención y caracterización de bancos de mutantes. Con esto se ha mostrado como las bacterias mutadas cambian su fenotipo al formar el biofilm y con esto se ha podido dilucidar los genes que participan en la formación de biofilm. Cabe señalar que dentro de estas comunidades aparte de darse una comunicación célula-célula por medio de señales integrales del quórum sensing, también se reciben señales extracelulares provenientes del ambiente como son los factores físicos y químicos. Esta interacción con el medio que rodea a la comunidad bacteriana y con las células que forman el biofilm, inicia una respuesta de las células activando cascadas de señalización, que van a regular cada paso de la formación de la biocapa por medio de la regulación de la expresión de genes.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con la bacteria *E. coli*, demostraron que el uso que medio suplementado con 100mM de MOPS (3-N-morfolino propano sulfonato), mantiene cambios mínimos en el pH del medio por 60 horas y favorece el establecimiento del biofilm en ensayos utilizando el método de O`Toole y Kolter (5, 19, 20). Además se mostró evidencia que la cepa W3110 de *E. coli* K-12 solo forma biofilm bajo condiciones aeróbicas, ya que no se encontró moléculas extracelulares provenientes de condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas que pudieran estar influyendo en la formación de biofilm, proponiéndose que el oxígeno juega un papel importante en la formación del biofilm (3). Ya que la cepa W3110 es de laboratorio y no presenta la

capacidad de formar biofilm bajo condiciones anaeróbicas, se ha empezado el análisis de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes ambientes ecológicos, encontrando que la capacidad de formar biofilm en condiciones anaeróbicas se encuentra en algunos aislados. Una parte importante de este análisis será el descifrar que señal este involucrada en este proceso, pero más interesante será el descubrir el porque el sobrenadante de cultivos de estas cepas ambientales promueven la formación del biofilm de la cepa de laboratorio W3110.

También se ha reportado diversos factores genéticos que afectan y promueven el desarrollo del biofilm. Como ejemplo de estos, se ha observado que el regulador *rpoS* (que codifica para una subunidad sigma de la RNA polimerasa) participa en el control de la cantidad de biofilm formado, en determinar su iniciación y en la prevención de la síntesis de un factor extracelular que aparentemente promueve la formación de biofilm durante la fase exponencial de crecimiento (4).

Por otra parte se ha iniciado el estudio de los determinantes genéticos que están involucrados en la adhesión a partículas de hidroxiapatita la cual se encuentra en la superficie dental y ha sido utilizada en diversos estudios sobre el proceso de colonización bacteriana.

Por eso la identificación de los factores ambientales, genéticos y de las moléculas participantes en la comunicación celular "quórum sensing", nos permitirá conocer los mecanismos moleculares involucrados en la formación del biofilm y por ende prevenir, controlar y manipular las etapas de desarrollo del biofilm y de esta manera comprender su comportamiento en la naturaleza.

Referencias

1. **Beloni, C.**, and J-M. Ghigo. 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *TRENDS in Microbiol.* 13:16-19.
2. **Burton, R.** and R. J. Lamont. 2000. Dental plaque formation. *Microbes and Infection.* 2:1599-1607.
3. **Colón-González, M.**, M. M. Méndez-Ortíz and J. Membrillo-Hernández. 2004. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 155:514-521.
4. **Corona-Izquierdo, F. P.** and J. Membrillo-Hernández. 2002. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 211:105-110.
5. **Corona-Izquierdo, F. P.** and J. Membrillo-Hernández. 2002. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Res. Microbiol.* 153:181-185.
6. **Costerton, J. W.**, Z. Lewandowski, D. Caldwell, D. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
7. **Fuqua, C.**, M. R. Parsek and P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35:439-468.
8. **Genevaux, P.**, S. Muller, and P. Bauda. 1996. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Letters.* 142:27-30.
9. **Hall-Stoodley, L.**, and P. Stoodley. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *TRENDS in Microbiol.* 13:7-10.
10. **Houdt, R. V.**, and C. W. Michiels. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156:626-633.
11. **Jefferson, K. K.** 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol. Letters.* 236:163-173.
12. **Kolenbrander, P. E.**, R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Egland, J. S. Foster, and R. J. Palmer Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:486-505.
13. **Kolenbrander, P. E.**, P. G. Egland, P. I. Diaz, and R. J. Palmer Jr. 2005. Genome-genome interactions: bacterial communities in initial dental plaque. *TRENDS in Microbiol.* 13:11-15.

14. **Kolenbrander**, P. E. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:413-437.
15. **Kuramitsu**, H. K. 2001. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3:35-36.
16. **Li**, Y-H., N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Y. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184:2699-2708.
17. **Marsh**, P. D. and D. J. Bradshaw. 1995. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J. Ind. Microbiol.* 15:169-175.
18. **Marsh**, P. D. 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J. Clin. Periodontol.* 32:7-15.
19. **O'Toole**, G. A., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
20. **O'Toole**, G. A., L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver, and R. Kolter. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310:91-109.
21. **Paster**, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183:3770-3783.
22. **Parsek**, M. R. and C. Fuqua. 2004. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186:4427
23. **Rudney**, J. D. 2000. Saliva and dental plaque.. *Adv. Dent, Res.* 14:29-39.
24. **Sauer**, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology.* 4:219.
25. **Schembri**, M. A., K. Kjaergaard and P. Klemm. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48:253-267.
26. **Stanley**, N. R. and B. A. Lazazzera. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* 52:917-924.
27. **Sutherland**, I. W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in Microbiol.* 9:222-227.
28. **Trémoulet**, F., O. Duché, A. Namane, B. Martinie, and J-C. Labadie. 2002. A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiology Letters.* 215:7-14.
29. **Zhang**, L-H., and Y-H. Dong. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53:1563-1571.

AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA GÁSTRICA INFLAMATORIA.

Marisela Olguín Martínez y Rolando Hernández Muñoz.

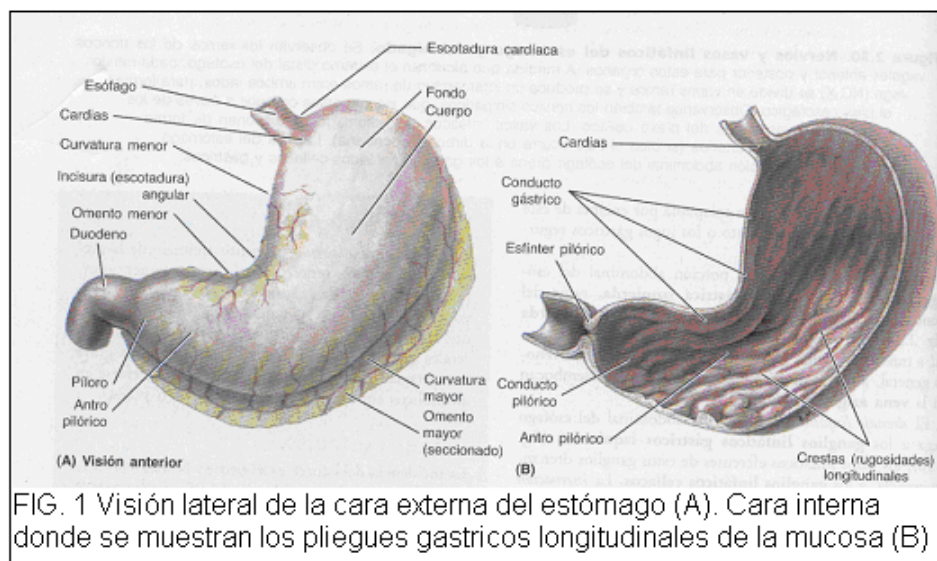
EL ESTOMAGO.

El estómago es la parte dilatada del tubo digestivo comprendida entre el esófago y el intestino delgado. La forma del estómago recuerda a la letra *J* en la mayoría de las personas; sin embargo, la forma y posición del estómago varían en las distintas personas e incluso en un mismo sujeto debido a los movimientos diafragmáticos que acompañan a la respiración, el contenido del estómago y la posición de la persona. Este órgano actúa como depósito y mezclador de alimentos, siendo su función principal, la digestión enzimática. En este contexto, el jugo gástrico va transformando poco a poco la masa de alimento en una mezcla líquida, conocida como quimo, que pasa con bastante rapidez al duodeno. El estómago vacío tiene un calibre un poco mayor que el del intestino grueso, pero se puede expandir de manera considerable y albergar de 2 a 3 litros de alimento (1).

Partes del Estómago. Desde el punto de vista anatómico, el estómago se divide en cuatro partes, las cuales son el cardias, el fondo, cuerpo, y la porción o antro pilórico (1). El cardias corresponde al punto de unión del esófago con el estómago; el fondo, es la porción dilatada superior que se relaciona con la parte izquierda del diafragma y con el cardias. Esta parte gástrica se dilata ante la presencia de gas, líquidos, alimentos, o por la combinación de ellos. En la parte inferior del fondo gástrico, se ubica el cuerpo, que se extiende caudalmente hacia la región del antro pilórico. En esta región, encontramos el píloro que representa la región esfinteriana distal de la porción pilórica; el antro pilórico se engruesa hasta el esfínter pilórico, que controla la descarga del contenido gástrico en el duodeno a través del orificio pilórico (Figura 1). Normalmente, el píloro tiene una contracción tónica, ya que se encuentra cerrado, salvo cuando evacua el quimo, que constituye el contenido semilíquido del estómago.

El peristaltismo gástrico, que tiene lugar en intervalos irregulares, pasa el quimo por el conducto pilórico hasta el intestino delgado para continuar la digestión y absorción.

Interior del Estómago; la mucosa gástrica. La superficie lisa de la mucosa gástrica, que es la capa mucosa del estómago, tiene un color rojizo o pardo *in vivo*, salvo en la porción pilórica, donde aparece rosada. Cuando se contrae la mucosa gástrica aparecen crestas longitudinales, pliegues o rugosidades gástricas (1). Estas se acentúan sobre todo en la porción pilórica y a lo largo de la llamada curvatura mayor. Durante la deglución se crea un conducto (surco) gástrico de forma pasajera entre los pliegues gástricos longitudinales de la mucosa de la curvatura menor. El conducto gástrico se establece por la inserción tenaz de la mucosa gástrica a la capa muscular, que no pone ninguna capa oblicua en este lugar (Figura 1).



FUNCION GASTRICA. Secreción de Jugo Gástrico.

Los componentes principales del jugo gástrico comprenden al ácido clorhídrico, la pepsina y el mucus (2).

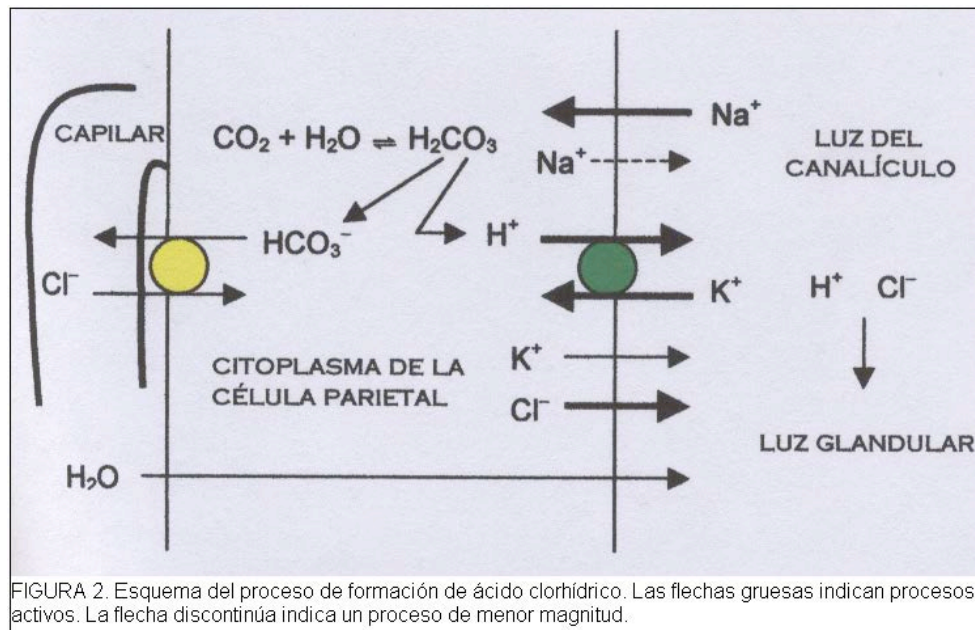
Estas moléculas se producen por células especializadas que se encuentran en las células gástricas, las cuales son principalmente de dos tipos: las *oxínticas* presentes en el fondo y la mayor parte del cuerpo del estómago, que vienen a representar el 75 al 80% del total celular, y las llamadas *pilóricas* que se localizan en la región astral, corresponden al 20% restante del total de las células glandulares. Las glándulas

oxínticas producen moco, ácido clorhídrico y pepsinógeno, a través de células especializadas. Las células *mucosas del cuello* son las encargadas de la producción del mucus, las *parietales* u *oxínticas* producen el ácido clorhídrico, y las células *principales* producen el pepsinógeno, a su vez. Las glándulas gástricas también contienen otras células endocrinas y de tipo *enterocromafínico*, localizadas en el fondo y cuerpo gástrico, mientras que las glándulas pilóricas contienen casi exclusivamente células mucosas y endocrinas (2). Entre las últimas, podemos resaltar la participación de las *células G*, que son las productoras de gastrina, hormona que participa de manera fundamental en la regulación de los estímulos para la secreción gástrica (2).

Secreción de Ácido clorhídrico. La producción de este ácido es una función exclusiva de las células parietales que se localizan en el cuello o istmo de las glándulas gástricas oxínticas. La morfología de las células parietales es de tipo piramidal, donde la membrana celular se encuentra invaginada en la parte apical, región que se caracteriza por la formación de canalículos (2). Cuando no están estimuladas para producir el ácido clorhídrico, los canalículos presentan en su interior una serie de vesículas, y la membrana circundante en los canalículos se organiza en microvellosidades cortas. Las proteínas que constituyen las bombas de H^+/K^+ se encuentran en las vesículas y se asocian con las membranas de los canalículos, formando una red amplia de microvellosidades largas en la región apical de las células parietales, como respuesta a un estímulo secretagogo. De esta manera, es en la superficie de estos canalículos, en donde se secreta el ácido clorhídrico hacia el lumen gástrico (2,3)

Normalmente, el jugo gástrico debe de tener un pH tan bajo como alrededor de un valor de 0.8, lo cual significa un aumento en la $[H^+]$ gástrica en cerca de un millón de veces, cuando se compara con la $[H^+]$ sanguínea. Los hidrogeniones del HCl provienen del ácido carbónico (H_2CO_3), el cual se forma en las células parietales por hidratación del CO_2 , reacción que cataliza la anhidrasa carbónica (3,4).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la formación del HCl. Por ejemplo, el ión cloruro del interior de la célula parietal se transfiere por transporte activo hacia la luz de los canalículos, mientras que el sodio del lumen de los canalículos se incorpora al citoplasma también a través de un transporte activo. Estos movimientos iónicos son responsables que en la luz de los canalículos se genere un potencial negativo (-40 a -70 mV) que provoca la salida de iones positivos, fundamentalmente el potasio y, en una proporción menor, la del sodio (4,5). Los H^+ intracelulares se transfieren activamente a la luz canalicular, en un intercambio por K^+ , con los cual se compensa la salida de este catión, debida a la generación del potencial negativo (Figura 2). De esta manera, los H^+ toman el lugar de los iones K^+ y Na^+ en la luz de los canalículos, donde también se acumulan los iones Cl^- . El aumento dramático de las concentraciones iniciales de H^+ and Cl^- da lugar a la salida de agua hacia el lumen de los canalículos, de tal manera que finalmente el líquido de los canalículos se hace isotónico, con aproximadamente 150 mEq/L de HCl, 15 mEq/L de KCl y de 3 mEq/L de NaCl (Figura 2). El bicarbonato que se forma por la ionización del ácido carbónico pasa a la sangre en intercambio de cloruro, restituyendo a este anión que se bombea continuamente hacia la luz de los canalículos (5). La cantidad sanguínea de bicarbonato, en una cantidad mayor de la normal, es lo que se conoce como la marea alcalina, la cual ayuda a neutralizar a los hidrogeniones que serán transferidos a la sangre por efecto de la formación de bicarbonato por el páncreas y el hígado (5).



Secreción de Mucus. La mucosa gástrica se encuentra expuesta a compuestos potencialmente deletéreos, como son las acciones del ácido clorhídrico y de la actividad enzimática, en forma de la actividad proteolítica de la pepsina, sales biliares procedentes del espacio duodenal (reflujo), medicamentos, alcohol, y agentes infecciosos como el *Helicobacter pylori*. Por tal motivo, la presencia de mucus gástrico es fundamental para la protección de la mucosa gástrica contra todos los agentes mencionados (5)

La secreción de mucus ocurre en las glándulas gástricas, tanto las oxínticas como en las pilóricas, pero se produce también en una capa continua de células mucosas, conocidas como células *mucosas superficiales*. La secreción mucosa es prácticamente insoluble y cubre toda la superficie interna del estómago con una capa de mucus de aproximadamente 1 mm de espesor. El mucus gástrico tiene un aspecto transparente y se halla constituido principalmente por agua, mucina (polisacáridos) y bicarbonato. Este último es el encargado de neutralizar el ácido clorhídrico que llega a penetrar la capa de mucus, de tal manera que se genera un gradiente de pH en el espesor del mucus, con un pH cercano a 2 en la cara luminar, y de 7 en la cara en contacto con la pared gástrica más expuesta, que está representada por el epitelio superficial de la mucosa (4,5).

Actividad Enzimática del Jugo Gástrico. La principal actividad enzimática del jugo gástrico está representada por la actividad de la pepsina, que es una proteasa que cataliza la hidrólisis preliminar de las proteínas de la dieta que se encuentran en el estómago. La pepsina cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que se hallan involucrados con sus grupos amino de aquellos aminoácidos aromáticos, como el triptofano, fenilalanina y tirosina, así como para la leucina y metionina. Por esta razón, las proteínas de la dieta son digeridas solo de manera preliminar por la pepsina, transformándose principalmente en polipéptidos de tamaño variable. Las células principales no producen en realidad pepsina, sino su zimógeno, conocido como pepsinógeno, un precursor inactivo de la pepsina. El pepsinógeno se secreta al jugo gástrico y ahí, debido al bajo pH existente, se promueve su conversión inicial a pepsina, por remoción de más de 40 residuos de aminoácidos en el extremo del α -NH₂ terminal. Una vez que se activó una pequeña cantidad de la enzima, ésta es capaz de promover la activación del pepsinógeno restante, evento que constituye una autocatálisis. La acidez gástrica tiene una importancia notoria para una acción adecuada de la pepsina, dado que es el único mecanismo de activación de dicha proteasa, además de que la pepsina tiene un pH óptimo de catálisis que corresponde a un valor de 1.8. Por otra parte, la acidez del jugo gástrico causa la desnaturalización de proteínas de la dieta, cuando se ingieren en su estado nativo, sin que la preparación de alimentos por cocción se lleve a cabo (3,4).

ENFERMEDAD GÁSTRICA INFLAMATORIA.

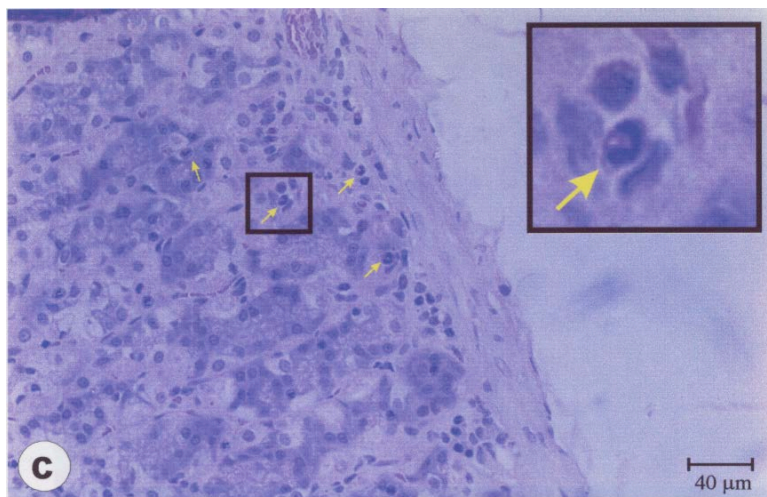
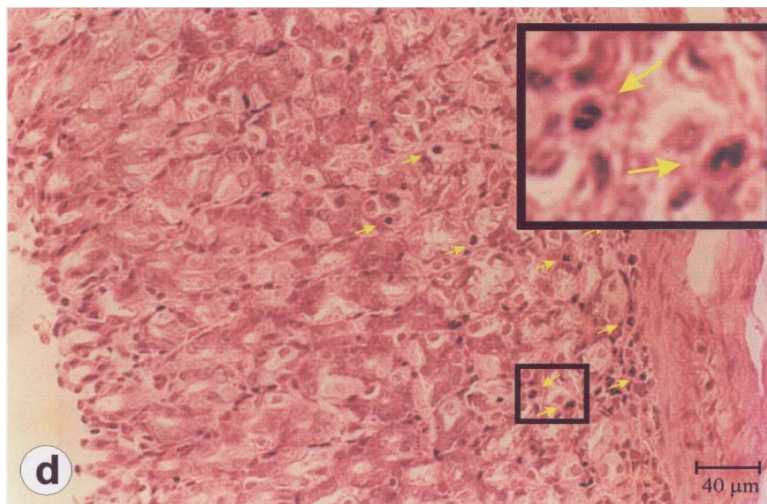
Las alteraciones más comunes de la mucosa gástrica son aquellas de tipo inflamatorio que conllevan a la gastritis primeramente y, en caso de seguir perpetuándose el daño, pueden culminar en una úlcera gástrica. La úlcera péptica es la ruptura de la mucosa con afección de la submucosa. A diferencia de la úlcera duodenal, la gástrica se asocia en una forma significativa con el desarrollo de procesos malignos. En la fisiopatología de la lesión inflamatoria gástrica, se reconocen dos factores con papeles

preponderantes: la colonización de la mucosa gástrica por el *H. pylori*, así como el uso crónico de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y/o el consumo de alcohol etílico. Ambas condiciones vulneran la integridad de las defensas naturales contra el efecto deletéreo del jugo gástrico, mientras que también proporcionan el ambiente adecuada para la génesis de un proceso ulceroso.

El *H. pylori* es un bacilo gram negativo, que se instala principalmente en la interfase entre la mucosa gástrica y la capa de mucus que recubre la superficie interna del estómago. Aunque puede unirse al epitelio gástrico a través de adhesinas, no parece existir una evidencia concluyente de que el *H. pylori* invada el epitelio. En condiciones normales, la interfase entre el mucus y la mucosa gástrica no es ácida, puesto que la capa de mucus presenta en su espesor un gradiente de pH, con valores muy bajo en la zona que se halla en contacto con el jugo gástrico, así como cercano a 7 en la parte que está en contacto con la mucosa gástrica. Sin embargo, el *H. pylori* se encuentra expuesto al medio ácido cuando ingresa al estómago y al abrirse camino a través del mucus gástrico por efecto de enzimas proteolíticas y lipolíticas que produce, es capaz de degradar los componentes químicos del mucus. De hecho, para evitar los efectos deletéreos del ácido clorhídrico, el *H. pylori* se encuentra dotado de un recurso enzimático que le permite alcalinizar el medio; el *H. pylori* posee la enzima ureasa, que al hidrolizar la urea, libera amoníaco al medio formando hidróxido de amonio a partir del agua, con lo que puede neutralizar el contenido de hidrogeniones del ambiente ácido en el estómago. Estos mecanismos que subyacen en la capacidad infectiva del *H. pylori* pueden incrementar la secreción ácida del estómago, lo que facilita la instalación del proceso ulceroso.

Por su parte, el uso crónico de AINEs, como la aspirina, producen alteraciones que van desde la dispepsia, úlcera gástrica y hasta la perforación y sangrado masivo. Los AINEs interfieren con la síntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica, y se sabe que tales moléculas actúan en un fenómeno llamado citoprotección. Las

prostaglandinas están involucradas en la preservación del flujo sanguíneo y la capacidad de restitución del epitelio gástrico; asimismo, estimulan la secreción de bicarbonato y mucus, pero inhiben la secreción de ácido, por lo que en suma, el bloqueo de su síntesis favorecería la hiperacidez y el desarrollo de la úlcera gástrica. Otro elemento importante en el desarrollo de la úlcera péptica por consumo de AINEs, se debe a que estos son ácidos débiles, y la abundancia de hidrogeniones en el jugo gástrico los mantiene sin ionizar, lo que permite que penetren por difusión simple. En cambio, en el medio intracelular, el aumento súbito del pH permite la ionización de estas moléculas, favoreciendo así sus efectos nocivos.



Los AINEs son conocidos inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, y dado que estas moléculas están involucrados en la preservación de la integridad física y funcional de la mucosa gástrica, el efecto de lo AINEs puede ser mediado parcialmente por la disminución importante de estas moléculas en la mucosa gástrica.

FIGURA. 3 Micrografías de la mucosa gástrica de ratas con un

cuadro de gastritis. Las ampliaciones y flechas señalan el infiltrado de polimorfonucleares.

AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA GASTRITIS EXPERIMENTAL.

Se han utilizado varios modelos experimentales para inducir un daño en la mucosa gástrica y, aunque los animales experimentales proporcionan una visión limitada de la patología en la mucosa gástrica humana, ofrecen buenas oportunidades para evaluar los mecanismos involucrados en el desarrollo y prevención del daño (6).

La mayoría de los modelos experimentales de daño a la mucosa gástrica producen un daño agudo (shock hemorrágico, altas concentraciones de agentes irritantes como etanol, ácido clorhídrico, etc.), donde se presentan lesiones hemorrágicas, disminución del grosor de la mucosa gástrica e hiperemia (6,7). En nuestra experiencia (8), hemos desarrollado un modelo de gastritis experimental en ratas inducida por un tratamiento crónico de alcohol etílico, que produce un perfil histológico caracterizado por la pérdida del epitelio superficial, alteraciones en la zona glandular o fóvea, así como por la presencia de un infiltrado de células inflamatorias, predominantemente de leucocitos polimorfonucleares. Estas alteraciones permanecen de 3 a 4 días después del retiro del alcohol, y el cuadro histológico es altamente reproducible.

El desarrollo de la gastritis se caracteriza por una alteración en la composición fosfolípida de la mucosa gástrica, la cual es posible inducirla por causas diversas. En humanos, se ha reportado que en cuadros de gastritis, los niveles de fosfatidiletanolamina y aquellos de fosfatidilinositol se encuentran disminuídos, mientras que la cantidad de fosfatidilcolina aumenta en membranas plasmáticas de células de la mucosa gástrica (9), mientras que sí el agente etiológico es el *H. pylori*, se han encontrado disminuciones en las cantidades de fosfatidiletanolamina, y de fosfatidilcolina. Con el uso de alcohol, también se ha encontrado un aumento en el nivel de fosfatidiletanolamina en estómagos ulcerosos (10); sin embargo, también se ha reportado un efecto exactamente contrario al anterior (11). En nuestro modelo de

gastritis alcohólica en ratas (8), hemos encontrado un aumento en los niveles de fosfatidiletanolamina y de fosfatidilserina, mientras que aquellos de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol decaen. El otro componente importante de la membrana plasmática, que es el colesterol, también presenta cambios importantes durante la génesis de la gastritis experimental. El colesterol está localizado preferentemente en la membrana plasmática; de hecho, la rigidez de esta membrana se incrementa cuando el contenido de colesterol aumenta (12). Se ha reportado que el daño a la mucosa gástrica produce un aumento en el nivel del colesterol en las membranas plasmáticas y de la relación colesterol/fosfolípidos. Esta relación también afecta la fluidez de la membrana y se incrementa cuando la permeabilidad membranal está alterada (8,11). La disminución de la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina producida por el alcohol coincide con un aumento en el nivel del colesterol y en la relación colesterol fosfolípidos, lo que sugiere un aumento en la rigidez de la membrana plasmática.

Algunas de las enzimas, como la 5'nucleotidasa se localizan principalmente en el lado externo de la membrana plasmática y se puede utilizar como un marcador de la pureza de ésta (13). La actividad de esta enzima puede estimularse cuando aumenta la fluidez de la bicapa, y este aumento puede deberse a un aumento en la flexibilidad conformacional de la enzima (14,15). Sin embargo, la 5'nucleotidasa también requiere de una rigidez mínima de la membrana plasmática, por lo que si se continúa el incremento en la fluidez de la membrana, se induce una inhibición progresiva de la actividad de esta enzima. La actividad de la 5'nucleotidasa depende de la presencia de fosfolípidos específicos, como el fosfatidilinositol (16), el cual parece intervenir en la unión de la enzima con la membrana (13,17). La actividad de esta enzima también se ve disminuida por un aumento en el nivel del colesterol (8,18). Se observado que, durante la gastritis experimental, la actividad de esta enzima se reduce en los animales afectados y subsecuentemente se normaliza a tiempos tardíos. La

disminución significativa de la actividad coincide con un aumento en otros parámetros de la fluidez membranal, como la relación colesterol/fosfolípidos.

Se considera que los ácidos grasos poli-insaturados es una característica de daño celular, y puede ocurrir por una sobre-producción de radicales libres, o por la deficiencia de los mecanismos de defensa, tanto extra- como intracelulares (niveles de glutatión, actividad de superóxido dismutasa, catalasa, etc.) (19,20). Se ha reportado que los radicales libres de oxígeno están involucrados en el daño de la mucosa gástrica (21), aunque el mecanismo exacto de formación de radicales libres todavía no se conoce. Los radicales superóxido e hidroxilo intervienen en la etapa inicial del desarrollo del daño gástrico inducido por alcohol (22).

En este contexto, nuestro grupo reportó recientemente que durante el daño crónico con alcohol, los parámetros indicativos de estrés oxidativo (TBARS) se incrementan de manera importante, lo que sugiere que se produce un estrés oxidativo durante la generación de la lesión gástrica inflamatoria (23). Sin embargo, también hemos observado que la regeneración del epitelio superficial que ocurre al retirar el alcohol, se acompaña por un aumento en la lipoperoxidación de las membranas plasmáticas. Este incremento se asocia con la restauración de la mucosa gástrica dañada debido a que la elevación de los niveles de TBARS coinciden con la actividad máxima de la enzima timidin-cinasa, lo que sugiere una relación directa y significativa entre el nivel de lipoperoxidación y la magnitud de proliferación celular. Esta relación se presenta de una manera muy similar a la encontrada en otro modelo de proliferación celular, como la que ocurre durante la regeneración hepática en ratas sometidas a una hepatectomía parcial (20,23).

Este último tópico, constituye un fascinante campo de estudio, donde estamos probando las interacciones de fármacos utilizados en el manejo de la enfermedad úlcero-péptica en nuestro modelo experimental y así, dilucidar cual es el verdadero papel de las especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, movilización de las pozas de

calcio y el metabolismo energético, sobre el progreso del ciclo celular que conlleva a una hiperplasia restaurativa, la cual se da en la mucosa gástrica dañada de ratas, una vez que se ha retirado el agente causante de la lesión.

Referencias.

1. Moore KL y Dalley AF. (Editores). Anatomía con orientación clínica. Cuarta edición, Editorial Médica Panamericana; Lippincot Williams & Williams, 2002.
2. Guyton AC, and Hall JE. (Editors). Textbook of medical physiology. 10th edition, W. B. Sanders Company, 2000.
3. Nelson DL and Cox MM (Editors). Lehninger, Principles of Biochemistry. 3th edition, Worth Publishers, 2000.
4. Smith ME and Morton DG (Editors). The digestive system. Basic science and Clinical conditions. Churchill Livingstone 2001.
5. Devlin TM (Editor). Textbook of biochemistry with clinical correlations. 5th edition, Wiley-Liss, 2002.
6. Mózsik G, and Jávör T. 1988. A biochemical and pharmacological approach to the genesis of the gastric ulcer. I. A model study of ethanol-induced injury to gastric mucosa in rats. Digest. Dis. Sci. 33: 92-105.
7. Ito S, and Lacy E. 1985. Morphology of rat gastric mucosal damage, defense, and restitution in the presence of luminal ethanol. Gastroenterology 88: 250-260.
8. Hernández-Muñoz R, and Montiel-Ruíz F. (1996). Reversion by histamine H₂-receptor antagonists of plasma membrane alterations in ethanol-induced gastritis. Digest. Dis. Sci. 41: 2156-2165.
9. Nardone G, D'Armiento F, Corso G, Coscione P, Esposito M, and Budilon G. 1994. Lipids of human gastric mucosa: effect of Helicobacter pylori infection and nonalcoholic cirrhosis. Gastroenterology 107: 362-368.
10. Mosnier P, Rayssiguier Y, Motta C, Pelissier E, and Bommelaer G. 1993. Effect of ethanol on rat gastric surfactant: a fluorescence polarization study. Gastroenterology 104: 179-184.
11. Slomiany A, Slomiany B, and Horowitz M. 1975. Studies on changes in lipid profiles of the rat gastric mucosa with stress ulcers. Clin. Chim. Acta 59: 215-226.
12. Voelker D. 1991. Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. Microbiol. Rev. 55: 543-560.
13. Thompson L, Ruedi J, and Low M. 1987. Purification of 5'nucleotidase from human placenta after release from plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14: 118-125.

14. Lehto MT, Sharom FJ. 1998. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *Biochem. J.* 332: 101-109.
15. Omodeo-Sale F, Lindi C, Palestini P, Masserini M. 1991. Role of phosphatidylethanol in membranes. Effects on membrane fluidity, tolerance to ethanol, and activity of membrane-bound enzymes. *Biochemistry* 30: 2477-2482.
16. Gordon L, Sauerheber R, Esgate J, Dipple I, Marchmont R, and Houslay M. 1980. The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membrane achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J. Biol. Chem.* 255: 4519-4527.
17. Merisko E, Ojakian G, and Widnell C. 1981. The effect of phospholipids on the properties of hepatic 5'nucleotidase. *J. Biol. Chem.* 256: 1983-1993.
18. Daveloose D, Linard A, Arfi T, Viret J, and Christon R. 1993. Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1166: 229-237.
19. Slater T. 1984. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222: 1-15.
20. Aguilar-Delfín I, López-Barrera F, and Hernández-Muñoz R. 1996. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC₄ administration. *Hepatology* 24: 657-662.
21. Pai R, and Tarnawski A. 1998. Signal transduction cascades triggered by the EGF receptor activation, relevance to gastric injury repair and ulcer healing. *Digest. Dis. Sci.* 43: 14-22.
22. Szelenyi I, and Brune K, 1998. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digest. Dis. Sci.* 33: 865-871.
23. Hernández-Muñoz R, Montiel-Ruíz C, and Vázquez-Martínez O. 2000. gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab. Invest.* 80: 1161-1169.

DE LA INVESTIGACION CLINICA A LA APLICACIÓN DE LA CLÍNICA EL CASO DE SIDA ORAL

**Gaitan-Cepeda LA.
Martínez-González M.
Leyva-Huerta E.**

La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es considerado como un problema de salud pública mundial. A la fecha más de 30 millones de personas en el mundo han muerto a consecuencia de la infección por VIH o asociada a alguna de sus complicaciones. Se presupone que actualmente existen más de 36 millones de personas infectadas por el VIH, los cuales de acuerdo a la información disponible, irremediablemente fallecerán. En el año 2004 se existieron 5 millones de nuevos casos en el mundo, mientras que en el mismo año se registraron 3.1 millones de muertes asociados a la infección por VIH. Nuestro país ocupa el lugar 23 de 48 países de Latinoamérica en incidencia de infección por VIH. CENSIDA-SSA de 1983 a noviembre de 2004 registró 90,043 sujetos VIH+, con un estimado probable de 160,000 mientras que sólo en ese mismo año hubo 4,700 muertes asociados a la infección por VIH, en nuestro país.

A partir de mediados de los años 90's se observó un reacomodo de los sitios de mayor incidencia de sujetos VIH+, concentrándose en países en vías de desarrollo. Actualmente 3 de cada 4 personas VIH+ viven en el África subsahariana. Situación que se agrava dadas las carencias tecnológicas, económicas y de infraestructura de esos países. De tal forma que el diagnóstico, evolución, y tratamiento de la infección por VIH es diferente en países desarrollados que en países en vías de desarrollo. La diferencia en los cuadros clínicos se traduce en una enorme diferencia en la morbi-mortalidad asociada a infección por VIH.

Las metas de investigación mundiales que se han propuesto podrían resumirse en: causas y características epidemiológicas; desarrollo de pruebas

diagnósticas; tratamientos, estrategias preventivas; y seguridad en el manejo de sangre y hemoderivados.

En el caso de los tratamientos antiretrovirales, a partir de 1997 con la introducción a la terapia antiretroviral de los inhibidores de proteasa del VIH-1 y su combinación con los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos nucleósidos, se establece la Terapia Antiretroviral Altamente Activa (TAAA). La TAAA ha cambiado dramáticamente el curso de la infección por VIH. Se ha demostrado que los pacientes VIH+/SIDA bajo TAAA muestran una disminución de hasta un 75% en lesiones oportunistas infecciosas, con reducción en la mortalidad de hasta un 50%. Posteriormente se han incrementado las posibilidades de tratamiento con la introducción y combinación de inhibidores de la transcriptasa reversa no-nucleosidos, habiendo a la fecha diferentes criterios respecto a los tiempos en que se deben aplicar dichos tratamientos.

Entre los muchos factores que influyen en la toma de decisiones para los cambios de tratamiento sobresale por su importancia el estado médico/salud de cada uno de los pacientes. En consecuencia se ha propuesto que las decisiones médicas de tratamiento siempre deben de estar basadas en el estado médico particular de cada uno de los pacientes. A la fecha se considera a la cantidad de linfocitos CD4+/ml de sangre periférica y a la cantidad de copias de RNA de VIH (carga viral) como los marcadores paraclínicos más específicos de progresión de la enfermedad por VIH. De tal forma que el estado inmunológico y el estado virológico soportan, en gran medida, la toma de decisiones terapéuticas. El objetivo ideal (éxito total) de cualquier tratamiento antiretroviral es disminuir la carga viral a niveles indetectables y de manera concomitante aumentar la cantidad de CD4+ por arriba de 500/mL. De tal forma que estos marcadores paraclínicos de progresión de la enfermedad también son utilizados como marcadores de éxito o fracaso de las terapias antiretrovirales.

Sin embargo en muchos países en vías de desarrollo o en áreas rurales o suburbanas la posibilidad de contar con monitoreos sistemáticos de los marcadores paraclínicos es poco factible. Los conteos de CD4 se obtienen a través de citometría de flujo, principalmente y la carga viral se establece

utilizando PCR. Para la determinación de los conteos de CD4 o de cargas virales se requiere de infraestructura especializada, equipo sofisticado y personal humano capacitado para tales procedimientos. Estas necesidades requieren de altos presupuestos para su desarrollo. Si consideramos, que el 75% de los pacientes VIH+ se concentran en países en vías de desarrollo, se puede inferir que probablemente gran cantidad de pacientes VIH+ no cuenten con datos respecto a su estado inmunológico y/o virológico.

Por otro lado, ciertas lesiones orales has sido estrechamente asociadas a infección por VIH. La Candidiasis Oral (CO) y la Leucoplasia Velloso (LV) se les atribuye un importante valor diagnóstico. En prácticamente todas las poblaciones VIH+ estudiadas en el mundo, se evidencia una muy fuerte relación entre presencia de CO y LV, y conteos de linfocitos CD4 por debajo de 200/mL (inmunodeficiencia severa). Posteriormente en un reporte de nuestro grupo de investigación pudimos establecer que también las infecciones orales oportunistas (IOO) están relacionadas con el estado virológico al haber establecido relación entre cargas virales >10,000/mL y prevalencias altas de IOO. De tal forma que nuestros resultados, junto con los de otros grupos de investigación hicieron surgir la posibilidad de proponer a algunas IOO, como marcadores clínicos de progresión de la enfermedad.

Como se mencionó en párrafos anteriores, la TAAA cambió dramáticamente la imagen clínica de la enfermedad por infección por VIH. Dada la importancia diagnóstica y pronóstica de las lesiones orales, se hizo imprescindible el establecer y difundir a la comunidad científica relacionada, cual es el comportamiento clínico de las lesiones orales en un paciente bajo TAAA, y si es que la TAAA influía en la relación entre IOO y estado de inmunodepresión severa. De tal forma abordamos de manera conjunta con el grupo de Investigación en SIDA de Andalucía, España, el dilucidar dicha interrogante. Nuestros resultados mostraron que aunque la TAAA disminuye notablemente la presencia de infecciones oportunistas orales, la CO continúa siendo la IOO más prevalente, y que su asociación con conteos bajos de linfocitos CD4 es independiente de la terapia antiretroviral. Además con la finalidad de comparar el comportamiento temporal de la CO en la era pre-TAAA vs era-TAAA se realizo un de cohorte de seguimiento por 5 años de una población VIH+.

Nuestros resultados muestran que si existe una disminución en la prevalencia de CO durante el período de tiempo estudiado, y que además a habido un reordenamiento de las formas clínicas de la misma con una disminución de las formas pseudomembranosas y un aumento de la Candidiasis eritematosa.

Con los resultados anteriores hicimos la propuesta de que la CO pudiera ser considerada como un marcador clínico de falla inmunológica en pacientes sometidos a TAAA. Se realizó una estrategia metodológica tanto clínica, epidemiológica y de matemática aplicada para aceptar o rechazar dicha propuesta. Se propone a la CO como marcador clínico ya que presenta las siguientes características: dada su localización intraoral su observación es de fácil acceso; los parámetros diagnósticos están perfectamente definidos y estandarizados; tanto para su observación como para su diagnóstico no se requiere de técnicas sofisticadas así como tampoco de métodos invasivos; todos los procedimientos mencionados anteriormente son de bajo costo.

La primera meta fue establecer la prevalencia de lesiones orales en una muestra de pacientes VIH+/SIDA bajo TAAA con un mínimo de 6 meses y que hubieran mostrado una perfecta adherencia a la TAAA. Se determinaron sus conteos de CD4 y cargas virales, para posteriormente dividir y clasificar a estos pacientes en función de su respuesta a la TAAA en los siguientes grupos: Respuesta virológica (cargas virales indetectables); Respuesta inmunológica (pacientes con conteos de linfocitos CD4 >500/ml); Falla Virológica (pacientes con carga viral >10,000/mL); Falla Inmunológica (pacientes con conteos de linfocitos CD4 <500/mL). De manera concomitante y dado que se ha reportado interacción entre ambos parámetros se formaron adicionalmente los siguientes grupos de estudio: "Éxito total" (pacientes con cargas virales indetectables y con conteos de linfocitos CD4 >500/mL); "Respuesta Virológica" (pacientes con cargas virales indetectables, con conteos de linfocitos CD4 <500); "Éxito Paradójico" (pacientes con cargas virales >10,000/mL, con conteos de linfocitos CD4 >500/mL); y Falla Total (pacientes con carga viral >10,000/mL y conteos de linfocitos CD4 <500/ml). La estrategia estadística fue la siguiente: análisis bivariado por cada uno de los grupos de análisis a través de la prueba de χ^2 con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$); como estimador del riesgo relativo de falla del tratamiento para cada grupo de estudio se utilizó el odds ratio (OR),

fijándose un nivel de confianza de 95%. Para analizar las respuestas inmunológica y virológica en función de la vía de contagio y de la presencia de lesiones orales, CO ó LV se utilizó un modelo de regresión logística múltiple. Se utilizaron los siguientes paquetes estadísticos utilizados Epi-Info 5.0; SPSS 10.0; NCSS 2001.

En base a los resultados de la regresión logística múltiple, se utilizó el modelo obtenido con la finalidad de estimar, la probabilidad de falla inmunológica en función de la presencia de lesiones orales. Se utilizó la siguiente ecuación para los parámetros establecidos en el modelo y las probabilidades predichas:

$$1 + e^{-(0.432 + 1.76*(CO+LO+LV) - 2.899*(LO+LV) + 227*(CO+LO) + 0.644*(LO))}$$

De acuerdo con esta fórmula llegamos a los siguientes resultados: Las probabilidades de falla inmunológica en presencia de las siguientes infecciones oportunistas son: CO + Lesiones orales + LV = 85% (IC95 57% - 96%); Lesiones orales + LV = 5% (IC95 2% - 13%); CO + Lesiones orales = 91% (IC95 54% - 99%), y cualquier lesión oral = 66% (IC95 56% - 75%). En relación a la vía de contagio la probabilidad de falla inmunológica ante la presencia de CO es: en varones que han tenido sexo con varones = 91%; pacientes infectados por vía heterosexual = 95%; y en sujetos adictos a las drogas por vía intravenosa = 96%. Basados en estos resultados proponemos que la presencia de CO en pacientes adultos VIH+/SIDA bajo TAAA es un marcador clínico confiable de falla inmunológica.

Una vez establecidos los parámetros de probabilidad, se procedió aplicar dichos conocimientos para la creación de una calculadora probabilística utilizando un programa de Excell (Microsoft). Este programa es compatible prácticamente con cualquier computadora, personal, portátil o aún del tipo "Palm", por lo que puede ser utilizada en cualquier situación. En este momento el proyecto se encuentra en fase de prueba de la calculadora probabilística, con el objetivo final, en caso de ser corroborada su confiabilidad, de ofrecer a la comunidad médica una herramienta, útil, de bajo costo que sugiera la posibilidad de identificar a pacientes VIH+/SIDA con falla inmunológica. Con

este proyecto de ninguna manera se pretende minimizar la enorme utilidad que tienen los marcadores paraclínicos en la identificación de pacientes con progresión de la enfermedad, sino es el contar con una herramienta útil que permita, en condiciones en las cuales no se pueda obtener los datos de dichos marcadores paraclínicos en grandes poblaciones, e identificar a probables pacientes con disminución de CD4 aún bajo Terapia antiretroviral. Evidentemente que una vez identificados dichos pacientes, con alta probabilidad de falla inmunológica, tendrán que ser corroborados por los métodos convencionales. Sin embargo, insistiendo una vez más en los sitios y situaciones demográficas/socioeconómicas donde se concentran actualmente la mayoría de la población VIH+, el poder tener disponible un método confiable y de muy bajo costo, coadyuvará a la mejor toma de decisiones terapéuticas.

Por otra parte, si es que nuestras metas y resultados finales, lo soportan, el reto de investigación para el futuro inmediato será, el establecer si la herramienta probabilística puede ser aplicada también en la población pediátrica VIH+/SIDA. El niño VIH+ tiene un comportamiento muy diferente de progresión de la enfermedad que el adulto VIH+. (Proyectos PAPIIT 214300 y 225202).

Los pacientes pediátricos VIH+ tienen un comportamiento diferente de la infección por VIH. Se identifican dos grupos poblacionales dentro de los niños VIH+, en relación a la velocidad de progresión de la enfermedad: Progresores rápidos y progresores lentos. En el caso de los progresores lentos, no existe por definición ningún antecedente en lo referente a su comportamiento clínico, y sin embargo su número se encuentra en ascenso continuo, por lo las propuestas de investigación en el futuro las pudiéramos organizar de la siguiente manera:

De manera permanente:

- 1) Investigación clínica descriptiva permanente de monitoreo de los pacientes pediátricos VIH+ y de los pacientes adolescentes VIH+ infectados de manera vertical. Descripción e identificación de formas clínicas diferentes de lesiones orales asociadas a VIH.
- 2) Investigación clínica de posibles relaciones y asociaciones entre lesiones orales presentes en pacientes pediátricos y adolescentes

VIH+/SIDA verticalmente infectados y diferentes tratamientos antiretrovirales.

- 3) Investigación clínica para establecer si es que las lesiones orales presentan algún tipo de cambio clínico o de comportamiento en adolescentes VIH+, así como establecer cuales son las necesidades de atención dental de este grupo poblacional específico.

A mediano plazo:

- 1) Establecer si es que la utilización de lesiones orales como marcadores clínicos de progresión de la enfermedad por infección por VIH conserva sus valores predictivos en la población pediátrica y adolescente VIH+.
- 2) Establecer los tipos de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la cavidad bucal de la población pediátrica y adolescente VIH+.
- 3) Determinar los diferentes grados de sensibilidad y resistencias a antimicrobianos de la flora potencialmente patógena de la población pediátrica y adolescente VIH+.

EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β) Y

Dra. Marina Macías-Silva.

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un grupo de polipéptidos multifuncionales con más de 40 miembros. Esta superfamilia se divide en varias subfamilias, entre las que se encuentran: los factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β s), las activinas e inhibinas, las proteínas formadoras de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y los factores neurotróficos derivados de la glia (GDNFs). Estos factores afectan diversos procesos celulares entre los cuales se encuentran la regulación de la diferenciación y la proliferación, así como procesos fisiológicos complejos como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también la formación del hueso, entre otros. Cabe señalar que alteraciones en la transducción de sus señales pueden contribuir al desarrollo de patologías tan diversas como son las enfermedades autoinmunes, la fibrosis y el cáncer.

Las Funciones del TGF- β

El TGF- β es el factor prototipo de esta superfamilia y por lo tanto ha sido el más estudiado. Las funciones del TGF- β son amplias, además de que casi todos los tipos celulares pueden secretarlo así como expresar a sus receptores. El TGF- β es un factor multifuncional, pero la actividad que lo caracteriza es su potente habilidad para inhibir la proliferación de las células. El TGF- β también regula la diferenciación celular, especialmente de las células del sistema inmune. Otras de sus acciones incluyen la habilidad para controlar la apoptosis

y la producción de matriz extracelular (ECM); así como la estimulación de la quimiotaxis de algunos tipos celulares. La producción de ECM representa su función más importante en las células mesenquimatosas, donde sus efectos sobre la regulación de la proliferación celular son generalmente menos evidentes. Sus efectos sobre la ECM se manifiestan en diferentes formas incluyendo un incremento en la expresión de proteínas de la ECM, el bloqueo de la expresión de proteasas degradadoras de la matriz (MMP, metaloproteasas), la inducción de la expresión de inhibidores de proteasas (TIMPs) y la regulación de la expresión de integrinas que actúan como receptores de diversos componentes de la ECM. Todos estos efectos en conjunto resultan en un aumento en la acumulación de la ECM y en la interacción de las células con la matriz. Estas funciones son muy importantes en el proceso de cicatrización, y ayudan a explicar el papel que tiene el TGF- en patologías como la fibrosis, enfermedades autoinmunes, enfermedades parasitarias y cáncer.

En mamíferos se han encontrado tres isoformas del TGF- β (β 1, β 2 y β 3), las cuales se sabe que están codificadas por genes independientes. El TGF- β 1 es la isoforma inducida en casos como respuesta al estrés, daño tisular o en enfermedades inducidas por oncogenes y transactivadores virales. Casi cualquier tipo celular en cultivo puede ser estimulado para que secrete TGF- β , y en la mayoría de las células y tejidos el TGF- β 1 es la isoforma predominante. Las líneas celulares tumorales generalmente expresan altos niveles de TGF- β 1 y la mayoría también han perdido la habilidad para responder a él, ya sea por la pérdida o alteración de alguno de sus receptores o de los intermediarios en su vía de señalización. Existe una expresión muy amplia del TGF- β en los organismos adultos, donde la mayoría de los tejidos pueden presentar una o las 3 isoformas, pero con algunas diferencias en su nivel de

expresión. Los principales reguladores de la expresión *in vivo* del TGF- β son cambios en los niveles de hormonas esteroides, el daño celular, el estrés, o las infecciones virales o por parásitos.

La Vía de Transducción del TGF- β

Los receptores para los ligandos de la familia del TGF- β son transmembranales y los complejos de los receptores constan de dos tipos de receptores, el tipo I y el tipo II. Las señales de las tres isoformas del TGF- β son mediadas por un solo receptor tipo II, llamado T R-II, y un solo receptor tipo I denominado como T R-I o ALK-5. Ambos receptores presentan tres regiones principales: un dominio extracelular capaz de unir al ligando, una región transmembranal y un dominio citoplásmico con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina. La activación de los receptores para el TGF- β comienza en la membrana plasmática, cuando el TGF- β se une al receptor tipo II (T R-II), lo que permite que entonces el ligando pueda interactuar con el receptor tipo I (T R-I o ALK5), formándose así un complejo que consiste de dos moléculas de T R-I y dos moléculas de T R-II. Cuando esto ocurre, el receptor T R-II fosforila al receptor tipo I en el dominio GS (llamado así por ser rico en glicinas y serinas), que se encuentra cerca de la región transmembranal. Esta fosforilación permite que ALK5 se active y pueda transmitir las señales del TGF- β al interior celular por medio de la activación de las proteínas Smad.

La activación del complejo ligando-receptores, permite la interacción directa de las proteínas Smads con el dominio de cinasa del receptor tipo I. Las proteínas Smad son hasta ahora los únicos sustratos identificados de los receptores tipo I y son consideradas como proteínas transductoras o efectoras, o bien como mediadores intracelulares de la vía del TGF- β . Las proteínas Smad se han clasificado en tres principales subfamilias, basándose en sus propiedades estructurales y funcionales:

- **R-Smads** o Smads activadas por el receptor, que incluyen a las Smad2 y Smad3 (activadas por TGF- β) y a las Smad1, Smad5 y Smad8 (activadas por BMPs).
- **Co-Smad** o Smad común, subfamilia compuesta exclusivamente por la Smad4 (común a todas las vías).
- **I-Smads** o Smads Inhibidoras, subfamilia de la que forman parte la Smad6 y la Smad7.

Las R-Smads y las Co-Smads tienen dos dominios muy conservados que forman estructuras globulares, el MH1 (N-terminal) y el MH2 (C-terminal), los cuales están conectados por una región de enlace (conocida como “linker”), rica en residuos de prolina y serina. Las I-Smads carecen del dominio MH1, sin embargo, poseen además del “linker”, el dominio conservado MH2 que les permite interactuar con el receptor tipo I. Para explicar la diversidad de respuestas dependientes de la vía del TGF- β , hay que tomar en cuenta además de los diferentes ligandos, las múltiples combinaciones que se pueden dar entre sus receptores, los receptores tipo II (5 subtipos) y los receptores tipo I (8 subtipos), siendo los receptores tipo I los que determinarán que tipo de R-Smad se activará corriente abajo.

Aunque no está muy claro como es que otras vías de señalización, diferentes a las Smad, están conectadas con la vía del TGF- β , si se sabe que contribuyen en sus respuestas. El hecho de que distintos tipos celulares respondan a un mismo estímulo de modo variado puede ser resultado de la comunicación cruzada o “crosstalk” entre las diferentes vías de transducción que estén presentes en la célula. De modo que dependerá de la relación que tenga el TGF- β con otras vías de señalización y por lo tanto del contexto celular, lo que determine la composición de los complejos transcripcionales que se unan con las Smads, y de ello finalmente dependerán los

genes que se prendan o se apaguen y la respuesta específica dada por cada tipo celular.

Dada la importancia que tiene la vía del TGF- β en la regulación de diversos procesos como son el crecimiento, desarrollo, la homeostasis y muerte celular, entre otros, se ha observado que alteraciones en esta vía de transducción contribuyen al desarrollo de diferentes patologías como son el cáncer, la fibrosis, enfermedades del sistema inmune, inflamaciones crónicas y otras. El uso de diversas tecnologías ha contribuido de manera muy importante en el conocimiento de los mecanismos de acción del TGF- β así como de sus puntos de regulación, y muchos de estos estudios se están enfocando principalmente en el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias.

La Regeneración y Fibrosis Hepáticas.

El hígado es un órgano muy importante en el cuerpo, que tiene un papel central en la homeostasis metabólica, ya que es el principal responsable del metabolismo, síntesis, almacenaje y redistribución de nutrientes como carbohidratos, grasas y vitaminas. Además, el hígado es el principal órgano que desintoxica el cuerpo. Estas funciones son principalmente llevadas a cabo por los hepatocitos, que constituyen el 80% de la población celular, el otro 20% corresponde a las células no parenquimatosas que comprenden a: las células endoteliales, las células de Kupffer y las células estrelladas. Estas últimas tienen como funciones principales almacenar a la vitamina A y la producción de proteínas de matriz extracelular, por lo que durante el daño hepático son las principales productoras de los factores que contribuyen al desarrollo de la fibrosis hepática.

La capacidad regenerativa del hígado es sorprendente y ha evolucionado para proteger a los animales del consumo de toxinas. La regeneración del hígado fue descrita por primera vez por los griegos en el mito de Prometeo: Zeus castiga a Prometeo, después de robar el secreto del fuego de los dioses del Olimpo,

encadenándolo a una piedra, donde fue atormentado por un águila que devoraba su hígado, el cual era regenerado tan pronto como este era devorado. El proceso regenerativo del hígado está más claramente demostrado en el modelo de hepatectomía parcial en roedores desarrollado por Higgins y Anderson en 1931. En este modelo, dos tercios del hígado son removidos por cirugía y el hígado restante crece hasta que la masa original es restaurada, aproximadamente una a dos semanas después de la cirugía. Lo que ocurre realmente en el hígado, es que hay una hiperplasia, durante la cual las células hepáticas maduras se replican y la masa original hepática se reestablece. Los factores de crecimiento y citocinas implicados en la regeneración del hígado son muchos, tales como el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), el EGF (factor de crecimiento epidérmico), los TGFs (factores de crecimiento transformantes), la insulina y el glucagón, así como el TNF- α (factor de necrosis tumoral) y la IL-6 (interleucina 6).

Daño Hepático y Fibrosis.

A pesar de las diversas fuentes que causan daño al hígado siempre se presenta una respuesta que implica la síntesis de proteínas de la ECM (fibrogénesis). Dependiendo de la duración del daño, el hígado puede simplemente regenerar su arquitectura original cuando el daño es agudo; o bien, si es un daño crónico, el hígado desarrolla un proceso de fibrosis. Un mecanismo clave en la fibrogénesis es la activación de las células estrelladas (HSC), observándose un cambio en su morfología hacia el fenotipo de miofibroblasto. Las principales características de su activación son: la pérdida de las vesículas almacenadoras de vitamina A y la aparición de la α actina de músculo liso (α -sma). La proliferación de las células estrelladas aumenta conforme el estímulo o daño continúa; otra propiedad que adquieren las HSC es la de contractilidad que es principalmente estimulada por endotelina-1 y TGF- β . En cuanto a cambios en su función: aumenta su capacidad de producción y degradación de matriz

extracelular, así como de la síntesis de inhibidores de metaloproteasas. La secreción de citocinas también es una característica de la activación de las HSC.

La fibrosis hepática se caracteriza por una acumulación de matriz extracelular, además de un cambio en la arquitectura y composición celular del hígado. Los componentes principales de esta matriz son la colágena tipo I y tipo III aunque también encontramos otros constituyentes como fibronectina y laminina. Un punto importante es la disminución de la degradación de la ECM al disminuir la síntesis de metaloproteasas específicas para las colágenas intersticiales y el incremento en la producción de inhibidores de metaloproteasas (TIMPs).

El TGF- β y la Regeneración del Hígado.

El TGF- β tiene un amplio rango de efectos, dependiendo del contexto ambiental y celular. En el hígado, El TGF- β y la activina son importantes factores reguladores, que controlan la proliferación y la muerte celular, pero bajo condiciones anormales, estas citocinas pueden contribuir al desarrollo de fibrosis hepática. En un principio se observó que el TGF- β inhibía la síntesis de DNA en cultivos primarios de hepatocitos estimulados por EGF o HGF, y más tarde se demostró que el TGF- también inhibía la respuesta proliferativa luego de una hepatectomía parcial en la rata. Además, si se bloquean las señales del TGF- β o de la activina *in vivo* se observa una proliferación de las células hepáticas. Se ha visto que la activina A y las 3 isoformas del TGF- β son inducidas durante la respuesta regenerativa a la hepatectomía parcial. Es interesante observar que durante la regeneración hepática, los hepatocitos llegan a ser insensibles a las señales del TGF- β y que el hígado puede aún crecer a pesar de la presencia de esta citocina, sin embargo los mecanismos por los que ocurre esto no se conocen.

La regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial es un modelo ampliamente estudiado de proliferación celular. Después de remover por

cirugía algunos de los lóbulos del hígado, las células restantes proliferan para restaurar la masa del tejido perdido. La síntesis del DNA se completa casi 72 horas después de la cirugía, pero el proceso total puede durar hasta 2 o 3 semanas. Por otro lado, se ha visto un crecimiento regenerativo muy similar después de un daño tóxico al hígado, por ejemplo con el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl_4). Se ha propuesto que mientras muchas citocinas parecen estar involucradas en el inicio de la regeneración hepática, el TGF- β es uno de los principales candidatos para detener la regeneración, una vez que se ha recuperado la masa hepática original y sus funciones.

El TGF- β es siempre secretado como un complejo latente y se encuentra *in vivo* principalmente en su forma latente. La latencia parece ser un paso crítico en el control de la actividad del TGF- β , ya que un aumento en la expresión del TGF- β no siempre correlaciona con un aumento en los niveles del TGF- β activo. Durante la regeneración del hígado, hay un aumento de los niveles del RNAm y de la proteína del TGF- β , pero no se sabe si este TGF- β está activo o latente. Además, los hepatocitos llegan a ser insensibles a las señales del TGF- β durante la regeneración hepática. Por lo cual, nosotros recientemente investigamos el estado de activación de la vía del TGF- β /Smads durante la regeneración hepática en ratones y exploramos los mecanismos de insensibilidad al TGF- β que presentan los hepatocitos durante este proceso.

El TGF- β funciona como un factor antiproliferativo para los hepatocitos. Sin embargo, por razones poco claras, los hepatocitos llegan a ser resistentes a las señales del TGF- β y pueden proliferar a pesar de la presencia del TGF- β durante la regeneración hepática. La actividad del TGF- β puede ser estudiada analizando la activación de las proteínas Smad, que son los efectores de la vía. Nosotros estudiamos la activación de las Smads, durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial o por daño con CCl_4 , midiendo los niveles de la proteína Smad2

fosforilada y por la aparición de los complejos Smad2/Smad4. Encontramos que las proteínas Smads están ligeramente activadas en los hígados en reposo, pero su activación se incrementa durante la regeneración. Además, observamos que los niveles de los inhibidores de la vía, SnoN y Ski, son incrementados durante la regeneración y que notablemente SnoN fue inducido principalmente en los hepatocitos. SnoN y Ski son represores transcripcionales que pueden provocar que las células se vuelvan resistentes al TGF- β al unirse a las Smads y bloquearlas. Los complejos entre Ski, SnoN y las Smad activas fueron detectados entre 2 y 120 horas después de la cirugía, justo durante la fase principal de proliferación celular en la regeneración del hígado. Estos complejos inhibidores de las Smads disminuyeron después de la restitución de la masa hepática original (5-15 días), sugiriendo que las Smad que continuaran aún activas, podrían participar en hacer que el hígado regresará a su estado de reposo. Nuestros datos muestran que las señales del TGF- β /Smad están activas durante la regeneración hepática y además sugieren que la inducción de los inhibidores Ski y SnoN podría explicar la resistencia de los hepatocitos al TGF- β durante la fase proliferativa de la regeneración del hígado. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder, algún día, explicar cuales son las funciones que tiene el TGF- β en el hígado.

Agradecimientos.

A todos los miembros del laboratorio 225 Norte del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Nuestro trabajo esta principalmente apoyado por donativos de DGAPA, UNAM (IN218501 y IN230504) y CONACyT (36676-N).

Referencias.

1. López-Casillas F (1998): El lado oscuro y el lado brillante del TGF- β . Mensaje Bioq. *XXII*: 137-161
2. Wrana JL, Attisano L, Ventura F, Weiser R y Massagué J (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-346
3. Macías-Silva M, Abdollah S, Pirone R, Hoodless P, Attisano L y Wrana JL (1996) MADR2 is a Substrate of the TGF- β Receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224.
4. Attisano L y Lee-Hoeflich ST (2001) The Smads. *Genome Biol* 2(8): reviews 3010.1-3010.8.
5. Shi Y y Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685-700.
6. Sosa-Garrocho M y M Macías-Silva (2004) El factor de crecimiento transformante TGF-beta: receptores y funciones. *Rev. Educ. Bioquím.* Vol 23(1) Marzo.
7. Macías-Silva M, W Li, JL Leu, MS Creasey y R Taub (2002) Ski and SnoN are upregulated during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 383: 832-836.
8. Taub R (2004) Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol Cell Bio.* 5:836-847.

Adaptaciones en la transducción de señales en los parásitos

M. Eugenia Torres-Márquez y Alicia Vega

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen comunidades de múltiples especies, la señalización entre las células se piensa ser parte de la dinámica de la comunidad. La placa dental humana es un ejemplo bien reconocido de una comunidad bacteriana de múltiples especies. Un sello de esta comunidad es la capacidad para co-agregar, la cual es una interacción célula-célula entre organismos genéticamente diferentes (Kolenbrander, 1988). Otro tipo de interacción física, la co-adhesión, se da entre un tipo celular suspendido y uno ya adherido a un sustrato.

Los cambios temporales en las poblaciones de bacterias sobre las superficies dentales después de la limpieza profesional son ordenadas y secuenciales (Nyvad y Kilian, 1987). Tales cambios secuenciales deben ocurrir a través del anclaje y crecimiento de diferentes especies bacterianas. Con el anclaje de cada nuevo tipo celular la superficie naciente se presenta una nueva superficie para el anclaje de otras clases de bacterias lo que da como resultado la progresión de superficies emergentes y los cambios concomitantes en la diversidad de especies (Kolenbrander and London, 1993). Tal coordinación implica comunicación. En la ausencia de comunicación estos cambios se darían al azar. Debido a la dinámica de crecimiento y adherencia, las poblaciones en la cavidad oral están cambiando constantemente aun durante los intervalos entre los tratamientos diarios de higiene bucal. También *in vitro*, a la mayoría de las especies cultivadas de bacterias bucales se le ha probado su capacidad para interactuar físicamente y adherirse a diferentes especies, y todas muestran patrones específicos de reconocimiento con sus células asociadas (Whittaker et al, 1996).

Las avenidas de comunicación entre estas poblaciones siempre en movimiento probablemente incluyen intercambio de metabolitos (Egland et al, 2004), reconocimiento célula-célula (Kolenbrander, 2000), intercambio genético (Li et al 2001) y moléculas de señalización producidas por el hospedero (Krisanparchornick et al 2000) u otras bacterias (Burguess et al, 2002). La quimiotaxis es un proceso que puede jugar un papel importante en establecer algunas de éstas interacciones. Estos diferentes procesos de señalización serán el tema de éste trabajo.

FORMAS DE COMUNICACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES

a) Intercambio metabólico

Dentro de la cavidad oral, las bacterias forman comunidades de múltiples especies que se distinguen principalmente por su localización (supragingival, vs subgingival vs epitelial). La comunidad subgingival tiene la mayor riqueza de especies y la mayor capacidad de resultados patogénicos, tal como la destrucción del tejido periodontal. En un examen de cocultivos de probables patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*, se encontró que la biomasa era mayor en los cocultivos que en los monocultivos respectivos. Una hipótesis sugiere que la co-agregación establece un arreglo espacial (ver figura 1) de las bacterias para facilitar la comunicación metabólica (Kolenbrander et al, 2002) Entre los componentes de los sobrenadantes de los cultivos se encontraban el succinato y diferentes ácidos grasos, particularmente de cadena corta, como el isobutírico (Grenier y Maynard, 1986). *Veillonellae* puede utilizar ácidos orgánicos de cadena corta, especialmente lactato para su crecimiento. Estos ácidos orgánicos son excretados por streptococos durante el crecimiento en azúcares y son la base de la comunicación metabólica *in vitro* (Mikx and Van derHoeven, 1975) e *in vivo* (Van derHoeven et al, 1978). Se ha mostrado que *veillonellae* no son capaces de colonizar la superficie dental sin los socios metabólicos streptococos y que las poblaciones mas grandes de *veillonellae* se desarrollan cuando sus socios los reconocen en la coagregación (McBride and Van der Hoven,1981). Estas dos especies de colonización temprana del biofilm de la placa dental, *Streptococcus gordonii* y *Veillonella atypica* son un par interesante de organismos co-agregantes por su interacción metabólica. *S. gordonii* genera energía por fermentación de azúcares, de tal forma que produce ácido láctico como producto final. *V. atypica* es incapaz de fermentar azúcares, pero usa ácido láctico como su fuente de carbono y energía favorita. Entonces se puede desarrollar una cadena alimenticia entre estas bacterias con un producto final que sirve como fuente de energía al siguiente. Adicionalmente, una de éstas simbiontes *V. atypica* produce una señal que causa a *S. gordonii* el incremento del gen de la α -amilase implicado en el metabolismo de azúcares, señal a la que responden solo las bacterias que se encuentran a unos pocos micrómetros de la otra (Egland et al, 2004).

La capacidad para extraer y acumular cationes divalentes puede ser un factor crítico en la colonización exitosa de las superficies bucales y en la comunicación con otros microbios residentes. *S. gordonii* DL1 expresa a ScaA, que es un transportador inducible de alta afinidad para Mn^{2+} (Kolenbrander et al, 1998). La ScaA permeasa es

una lipoproteína, parte de un casete de unión para ATP, codificado por los tres genes del operón sca (Kolenbrander et al, 1997) y se requiere para el crecimiento en condiciones limitantes de Mn^{2+} . Los genes que codifican para este sistema de transporte y secuencias homólogas se han encontrado en algunos estreptococos bucales. Estudios previos sugerían a la proteína Sca A como una adhesina que mediaba la congregación entre los estreptococos y algunas cepas de *Actinomyces naeslundii* (Kolenbrander et al, 1994). La función agregativa de ScaA puede ser la de secuestrar el metal del hospedero y proveer del catión divalente a los demás organismos que no son capaces de hacerlo. La co-agregación y la cohesión puede ser el medio de proporcionar a los cationes divalentes entre las poblaciones. El transportador se encuentra en las superficies de los estreptococos donde podría enviar Mn^{2+} a las fusobacterias en las formaciones de tipo olote o participar en la adherencia (Kolenbrander, 2000)

En las formaciones de olote (ver figura 1) cada tipo celular que lo compone tiene capacidades metabólicas distintas y, por consiguiente, una variedad de vías de comunicación metabólica potencial entre las células de la periferia y las del centro. Por ejemplo, *F. nucleatum* es un fermentador de aminoácidos y los estreptococos son fermentadores de azúcares que producen ácido láctico, el cual es un sustrato fermentable utilizado por los veillonelae. Algunos estreptococos viridianos producen sialidasa y una variedad de exoglicosidasas que degradan las cadenas laterales de los glicanos de las glicoproteínas de los hospederos para producir carbohidratos fermentables (Byers et al, 1999). Estos carbohidratos se usan por un amplio espectro de bacterias incluyendo las fusobacterias, que en presencia de los aminoácidos fermentables glutámico, lisina o histidina como fuentes energéticas acumulan glucosa y galactosa en forma de gránulos semejante a glucógeno. El intercambio nutricional entre las células tiene efectos sobre el pH de la comunidad. Asimismo, el pH de la comunidad tiene efectos sobre la composición microbiana (Marsh and Bradshaw, 1997)

Las comunicaciones metabólicas antagónicas también pueden ocurrir. El peróxido de hidrógeno se produce por algunos estreptococos viridianos y matan al inhibir el crecimiento de otras bacterias bucales que son mas sensibles a las condiciones aeróbicas que estos estreptococos. Este es un parámetro asociado a la salud y se ha asociado la colonización por estas bacterias al establecimiento de una capa biológica saludable (Barnard y Stinson, 1999).

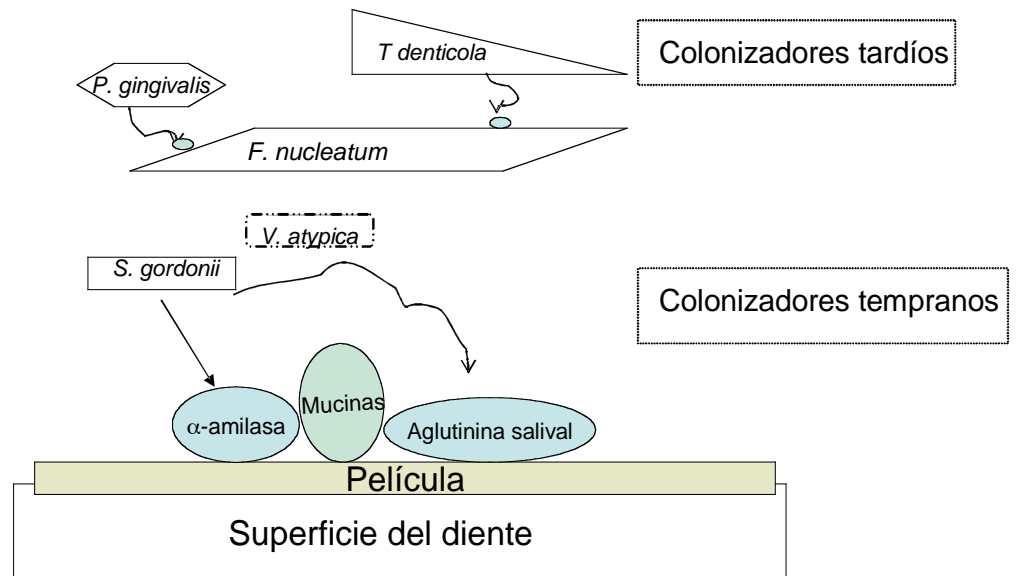


Fig 1 Comunicación célula-célula (formaciones de olote).

Los primeros colonizadores se unen por receptores a componentes en la película que se forma en el diente, posteriormente estos producen metabolitos que generan la coagregación de colonizadores tardíos, los cuales atraen a otros, etc.

S = *Streptococcus*, V = *Veillonella*, T = *Treponema*, F = *Fusarium*, P = *Porphyromonas*

b) reconocimiento célula-célula y señales bacteria-bacteria

Las especies bacterianas se encuentran en complejos en las placas subgingivales (fig 1). Uno de los complejos que consiste de *Bacteroides forsythus*, *P. gingivalis* y *T. denticola*; correlacionó estrictamente con enfermedades periodontales, tales como: la periodontitis de encendido temprano, la gingivitis ulcerativa necrozante y la pricornitis acuda., particularmente a la profundización de la las cavidades y sangrado (Socransky et al, 1998).

Otra forma de comunicación puede estar en la forma de proteólisis e invasión del tejido hospedero. *Fusarium nucleatum* no es proteolítico pero une al plasminógeno, que puede ser convertido en plasmina. La activación se puede conseguir incubándolo con steptocinasa o con el sobrenadante del cultivo de *P. gingivalis* (Darenfed et al, 1999). Este último es fuertemente proteolítico y un fuerte socio coagregativo para *F nucleatum* (Kolebrander and Andersen, 1989).

P. gingivalis produce gran cantidad de exoproductos dentro de los cuales están promotores del anclaje, factores promotores de la degradación en el tejido del huésped

y moléculas efectoras del sistema inmune y aquellas que facilitan la adquisición de nutrientes y la invasión celular (Lamont and Jenkinson, 1998). Los determinantes de virulencia mas extensamente estudiados son las exoproteasas. Las dos clases principales de cisteínas proteasas específicas son para los enlaces Arg-X y Lis-X a las que se les ha denominados Arg-gingipaina (Rgp) y Lis-gingipaina (Kgp) cuyos genes codificantes se denominan *rgpA* y *kgp*. Ambas se transcriben de un gene predecesor poliproteico (Curtis et al, 1999). El precursor original de RgpA, consiste de un dominio pro- α catalítica, un dominio β -adhesina/haemaglutinina y un dominio γ terminal que al romperse genera 3 formas de isoenzimas maduras gpA. Estas proteasas degradan una gran cantidad de proteínas del huésped incluyendo inmunoglobulinas, enzimas de la cascada del complemento, colágena, fribrinógeno y fibrina. De tal manera que no solo promueven la resistencia los mecanismos de defensa del hospedero, sino que también generan aminoácidos libres y péptidos pequeños que se usan como nutrientes. Mas aún, los dominios RgpA y Kgp comparten homologías de secuencias con la hemaglutinina HagA, que es funcional (Han et al, 1996). *P. gingivalis* también tiene 4 genes mas de hemaglutininas, *hagB*, *hagC*, *hagD* and *hagE*; (Lépine et al., 1996), y la capacidad para aglutinar fuertemente a los eritrocitos (Mayrand and Holt, 1988). Todas estas moléculas promueven la adherencia y colonización de los tejidos de la superficie y promueven el anclaje y desunión de los tejidos blanco humanos (Chen et al., 2001).

Los factores de virulencia, como las fimbrias y las hemaglutininas son modificados por la temperatura y la disponibilidad de hemina por la presencia de suero y saliva. La regulación de los genes de virulencia, se da a nivel transcripcional y post-transcripcional (Xie et al, 2000)

Estos a su vez podrían estar regulados por la densidad celular denominada sensora de quórum. Esta señal involucra la activación de un sensor o regulador de la respuesta por una pequeña molécula difusible, y algunas moléculas de distintas familias. Una de estas moléculas en las bacterias gram-negativas es de la familia de las *N*-acilhomoserine lactosas, AHLs (Whiters et al, 2001).

T. denticola se ha mostrado adherir a fibroblastos y células endoteliales y a componentes de la matriz extracelular presentes en los tejidos periodontales y producir factores que pueden contribuir a la virulencia entre estos están: homólogos a las ya descritas (proteasas y adhesinas), peptidasas asociadas a la vaina externa y una proteína formadora de poros en la capa externa (Sela, 2001) La co-adhesión parece ser mediada por proteínas complementarias, adhesina y el sacárido del receptor de los dos tipos celulares (Pace, 1997).

c) Señales generadas por la bacteria en el huésped.

Las células de la mucosa epitelial expresan péptidos antimicrobianos, incluyendo las β -defensinas 1 (hBD-1) y hBD-2, así como las chemocinas que atraen a los monocitos y los neutrófilos y las citocinas que activan al sistema inmune adaptativo (Kagnoff y Eckmann, 1997). Se sabe ahora que el antimicrobiano hBD-2 también estimula la presentación antigénica de las células dendríticas que señalizan al sistema adaptativo inmune (Yang et al, 1999). Existen diferencias dramáticas en la regulación de hBD-2 por los extractos de *F. nucleatum* y *P. gingivalis*. *F. nucleatum* no se considera dentro de los microorganismos causantes de enfermedades periodontales sino un puente entre los colonizadores de la película dental y la adherencia subsiguiente de los patógenos como *F. nucleatum*. Así que la pared celular de *F. nucleatum* indujo la transcripción de hBD-2, IL-8 y TNF- α , pero no la de *P. gingivalis* (Krisanaprakornkit et al, 2000), incluso se ha propuesto que puede inhibir la producción de IL-8 (Darveau et al, 1998)

Quimiotaxis

Las bacterias responden quimotácticamente a ciertos estímulos ambientales que probablemente están en las cavidades periodontales de tejidos inflamados (Sim et al, 2005). Recientemente la quimiotaxis y la motilidad se han correlacionado con la capacidad de *T. denticola* para penetrar en los tejidos (Lux et al, 2001). Esta correlación quimiotaxis/motilidad a virulencia se ha reportado para otros organismos (Josenhans & Suerbaum, 2002; Lux & Shi, 2004).

En *E. coli* la señal para la atracción o repulsión química (figura 2) se recibe por 4 proteínas aceptoras de metilo transmembranales (MCP) que responden a cambios en la concentración de un número limitado de quimioefectores periplásmicos. Cuando un atrayente se une o un repelente abandona el dominio periplásmico de la MCP, ocurre un cambio conformacional (Falke y Hazelbauer, 2001), esta señal se transmite a través de la proteína de unión citoplásmica cheW a la proteína cinasa soluble CheA (Gegner et al, 1992), la cual se autofosforila (Schuster et al, 1993) y entonces este fosfato se transfiere a un regulador de la respuesta CheY. Esta proteína CheY se une al motor flagelar donde causa un cambio de dirección de la rotación de contrasentido a las manecillas del reloj al sentido de éstas, lo que da como resultado la orientación de la célula (Bren y Eisenback, 2001)

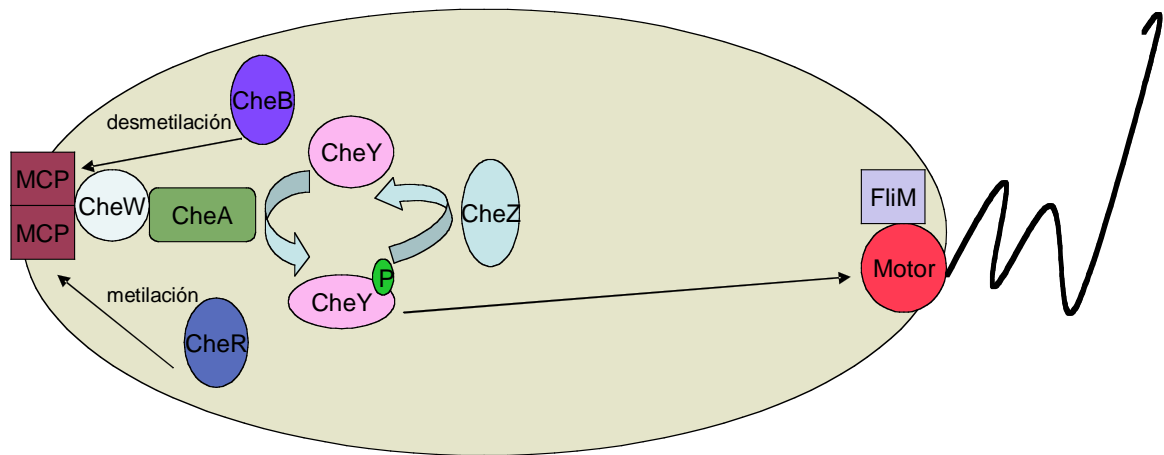


Fig 2. Quimotaxis esquematizada.

El estímulo llega a las proteínas aceptoras de metilo transmembranales (MCP) que cambian conformacionalmente para transmitir la señal a CheW, el cual a su vez une a CheA. CheA es una cinasa que se activa y fosforila a la proteína de respuesta CheY, esta proteína se desplaza hasta el flagelo para cambiar el sentido de su rotación y por tanto la dirección del movimiento hacia su estímulo.

La adaptación a un nivel basal estable de atrayente se logra por la variación de los grados de metilación de residuos específicos en los dominios de señalización citoplásmica de la MCP. Los grupos metilos se transfieren a la MCP por la metiltransferasa constitutivamente activa CheR y son removidos por la metilesterasa Che B, cuya actividad enzimática se incrementa por la fosforilación por Che A-P (Springer y Koshland, 1977 ; Yonekawa et al, 1983).

La chemotaxis en algunas otras bacterias es mas compleja.

ELEMENTOS DE LAS VÍAS DE COMUNICACIÓN QUE PUEDEN SER UTILIZADOS CON FINES TERAPÉUTICOS.

Se podría considerar que la información que se pueda obtener de mutantes en la colonización del huésped, tiene potencialmente uso terapéutico. En este sentido de una colección de *S. gordonii* mutantes deficientes en su capacidad de colonizar, se puede observar que los genes afectados son principalmente los que codifican para proteínas de superficie como la proteína enlazante de α -amilasa, transportadores de oligopéptidos y cationes, proteínas de unión a penicilina y componentes de las cinasas sensoras de dos componentes (Loo et al, 2000). Otros elementos de importancia

podrían ser los involucrados en la síntesis de polisacáridos, que codifican para la fructosil y glucosiltransferasas, a saber por una mutante de *S. mutans* incapaz de sobrevivir (Burne et al, 1997). También la mutagenesis en genes de invasión ha dado resultados sugerentes, como es el caso observado con la mutación en *P. gingivalis* de los genes que codifican para las proteasas Arg-gingipaina and Lys-gingipaina, lo que redujo en 10 veces la invasión. (Park and Lammont, 1998).

CONCLUSIONES

Un concierto de mecanismos de comunicación ocurre para establecer la organización de las comunidades transitorias. Las especies participantes en estas comunidades bucales compiten y cooperan en la vía para establecer una comunidad clímax que puede comprender todos los miembros de más de 500 especies conocidas. Es necesario continuar con el estudio de éstos mecanismos, pues con todo, se conoce poco acerca de los mecanismos de comunicación utilizados por las bacterias bucales para establecer estas comunidades y prevenir la desaparición de su hábitat.

Referencias.

- Andersen RN, Lunsford RD, Kolenbrander PE. 1997. Determination of the transcript size and start site of the putative sca operon of *Streptococcus gordonii* ATCC 51656 (formerly strain PK488). *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:657–60
- Barnard JP, Stinson MW. 1999. Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun.* 67:6558–64
- Burgess, N. A., D. F. Kirke, P. Williams, K. Winzer, K. R. Hardie, N. L. Meyers, J. Aduse-Opoku, M. A. Curtis, and M. Camara. 2002. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology* 148:763-772
- Burne RA, Chen YY, Penders JE. 1997. Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. *Adv. Dent. Res.* 11:100–9
- Byers HL, Tarelli E, Homer KA, Hambley H, Beighton D. 1999. Growth of viridans streptococci on human serum α_1 -acid glycoprotein. *J. Dent. Res.* 78:1370–80
- Chen, T., Nakayama, K., Belliveau, L. & Duncan, M. J. (2001). *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 69, 3048-3056.
- Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C. & Aduse-Opoku, J. (1999). Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 34, 464-472
- Darenfed H, Grenier D, Mayrand D. 1999. Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis. *Infect. Immun.* 67:6439–44
- Darveau R P, Belton C M, Reife R A, Lamont R J. (1998) Local chemokine paralysis: a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 66:1660–1665
- Egland PG., Palmer RJ, Jr. and Kolenbrander PE (2004) Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*–*Veillonella atypica* biofilms: Signaling in flow conditions requires juxtaposition. *PNAS* 101:16917-16922
- Grenier, D., and D. Mayrand. 1986. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect. Immun.* 53:616-620
- Han, N., Whitlock, J. & Progulske-Fox, A. (1996). The hemagglutinin gene A (*hagA*) of *Porphyromonas gingivalis* 381 contains four large contiguous direct repeats. *Infect Immun* 64, 4000-4007
- Josenhans, C. & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 605–614

- Kagnoff M F, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Investig.* 1997;100:S51–S55
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Baker RA, Jenkinson HF. 1998. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J. Bacteriol.* 180:290–95
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, and Palmer, RJ Jr. (2002) Communication among Oral Bacteria. *Microbiol and Mol Biol Revi* 66: 486-505.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, and Palmer, RJ Jr. (2002) Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 486-505.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Ganeshkumar N. 1994. Nucleotide sequence of the *Streptococcus gordonii* PK488 coaggregation adhesin gene, *scaA*, and ATP-binding cassette. *Infect. Immun.* 62:4469–80
- Kolenbrander PE, Andersen RN. 1989. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect. Immun.* 57:3204–9
- Kolenbrander, P. E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:627-656
- Kolenbrander, P. E. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:413-437.
- Kolenbrander, P. E., and J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 175:3247-3252
- Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, A. Weinberg, R. P. Darveau, B. W. Bainbridge, and B. A. Dale. 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* 68:2907-2915
- Lamont, R. J. & Jenkinson, H. F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1244-1263
- Lépine, G., Ellen, R. P. & Progulske-Fox, A. (1996). Construction and preliminary characterization of three hemagglutinin mutants of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 64, 1467-1472
- Li, Y.-H., P. C. Y. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. 2001. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* 183:897-908

- Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that encode for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 182:1374–82
- Lux, R. & Shi, W. (2004). Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 207–220
- Lux, R., Miller, J. N., Park, N. H. & Shi, W. (2001). Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. *Infect Immun* 69, 6276–6283.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. 1997. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv. Dent. Res.* 11:176–85
- Mayrand, D. & Holt, S. C. (1988). Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 52, 134-152
- McBride, B. C., and J. S. van der Hoeven. 1981. Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens*. *Infect. Immun.* 33:467-472.
- Mikx, F. H., and J. S. van der Hoeven. 1975. Symbiosis of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in mixed continuous cultures. *Arch. Oral Biol.* 20:407-410
- Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:1980–84
- Nyvad, B., and M. Kilian. 1987. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand. J. Dent. Res.* 95:369-380.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740
- Park Y, Lamont RJ. 1998. Contact-dependent protein secretion in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 66:4777–82
- Sela M. N. (2001) Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12, 399-413
- Sim JH, Shi W and Lux R (2005) Protein–protein interactions in the chemotaxis signalling pathway of *Treponema denticola* *Microbiology* 151 (2005), 1801-1807
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25:134-144
- van der Hoeven, J. S., A. I. Toorop, and F. H. Mikx. 1978. Symbiotic relationship of *Veillonella alcalescens* and *Streptococcus mutans* in dental plaque in gnotobiotic rats. *Caries Res.* 12:142-147
- Whittaker, C. J., C. M. Klier, and P. E. Kolenbrander. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:513-552.

- Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 186
- Xie, H., Chung, W. O., Park, Y. & Lamont, R. J. (2000). Regulation of *Porphyromonas gingivalis fimA* (fimbriillin) gene. *Infect Immun* 68, 6574-6579.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia S N, Chen Q, Buffo M J, Shogan J, Anderson M, Schröder J M, Wang J M, Howard O M Z, Oppenheim J J (1999). β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 286:525–528

Factores Etiológicos de la Enfermedad Pulpo Periapical

Dr. Luis García Aranda.

A la Periodontitis se le puede definir como la inflamación del ligamento periodontal que está circundando a la raíz del diente, esta enfermedad se presenta por diversas causas que van desde la simple inflamación pulpar hasta la necrosis pulpar, pasando por todos los procedimientos dentales y de tratamiento relacionado con la Endodoncia y periodoncia, Hueso lisado como producto de la inflamación que rodea al ápice del diente es substituido por tejido de granulación. A esta substitución se le llama también Granuloma y que regularmente se presenta asintomático, radiográficamente se puede presentar como una lesión de hueso interpretada como radiolucencia y es circundando al ápice del diente Fig. 1



Fig. 1 Lesión en hueso Cortical y en área Periapical PA

Las infecciones de la pulpa pueden ocurrir como consecuencia de la caries dental, procedimientos dentales y trauma e involucra a una mezcla de bacterias anaerobias de la flora bacteriana principalmente por Gram negativos (1). Este tipo de infecciones regularmente inician una respuesta inmune en pulpa, que de manera muy regular es poco efectiva para eliminar las bacteria que la están invadiendo. Como consecuencia de esto las inflamaciones pulpares producidas por bacteria terminan en necrosis pulpar y como consecuencia generan una respuesta inflamatoria secundaria en la región periradicular. Tanto la inflamación pulpar y periapical inicialmente generan una respuesta inmune particularmente influida por fagocitos y la producción de citocinas proinflamatorias. De manera de que la inflamación se torna crónica elementos inmunes adaptativos son activados y llega a ser sobre puesto en la respuesta inicial incluyendo células T y B llevando a una típica respuesta celular mixta. Fig. 2

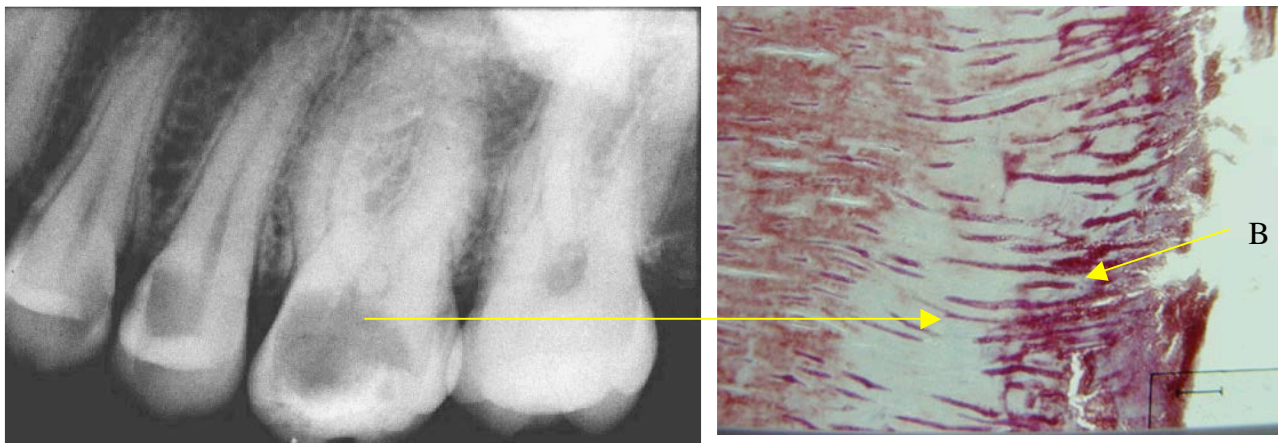


Fig.2 La caries (Derecha), tubulos dentinarios con bacterias en su interior (B)

Cuando el agente etiológico ha rebasado la pulpa e irrita al periodonto a esta respuesta se le conoce como la segunda línea de defensa y a esta respuesta

se le conoce como Periodontitis apical o Lesión Periapical, es caso de que el agente irritante sean bacterias estas se encuentran confinadas al conducto radicular Fig. 3, la respuesta del tejido periodontal se puede considerar como una recapitulación de la respuesta pulpar con la diferencia que en la inflamación periapical se va a presentar un fenómeno de adición de destrucción de hueso Fig. 4.

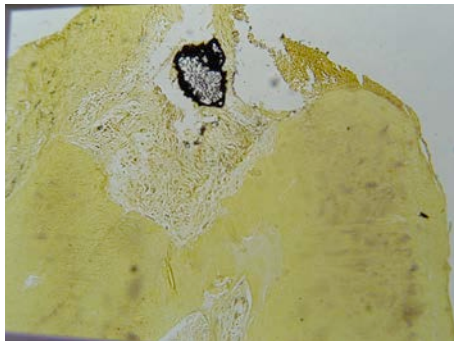


Fig. 3 Presencia de colonias de bacterias en la Región Periapical

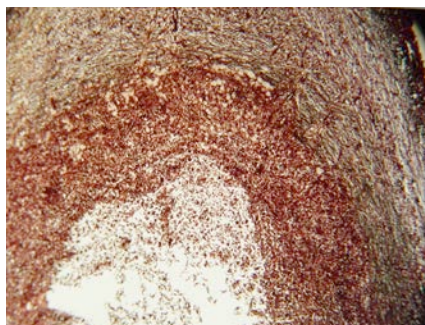


Fig. 4 Observamos la destrucción de hueso alveolar Tejido de granulación y Tejido fibroso

Okiji T, (2), entre otros autores en animales de experimentación y el tiempo de la infección es controlada la respuesta inicial del periodonto involucra la entrada

de polimorfonucleares y monocitos 3 días después de la exposición pulpar, las células inflamatorias en periodonto, incrementan el número de osteoblastos y de destrucción ósea avanzado como la presencia de una necrosis pulpar total, al mismo tiempo cuando hay la presencia de pulpa vital en la región apical, esto puede explicar al clínico la presencia de dolor (por tejido pulpar vital), esta presente en lesiones periapicales Fig. 5.

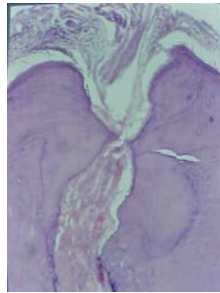


Fig. 5 Resto de pulpa vital en la región apical

Dependiendo de las manifestaciones clínicas, estas lesiones son clasificadas como agudas y crónicas .

Periodontitis Apical Aguda

Es un proceso inflamatorio confinado al periodonto principalmente al ápice radicular, la principal causa de esta inflamación son los irritantes que se difunden a través del conducto radicular por una pulpa inflamada o con la presencia de necrosis pulpar.

La salida de toxinas de la necrosis o de bacterias, medicaciones, agentes desinfectantes, virutas de dentina impactadas hacia los tejidos periapicales o trauma , pueden ser las causas mas frecuentes de una periodontitis apical aguda.

Dolor a las percusiones y a la masticación es la principal característica sintomatológica de la periodontitis apical aguda, el dolor es patognomónico y tiene una variación de leve a severo a hacer contacto con el diente antagonista. Histopatológicamente el análisis de la Periodontitis Apical Aguda revela un infiltrado inflamatorio en el ligamento periodontal, las células inflamatorias iniciales son principalmente leucocitos Polimorfonucleares con células mononucleares dispersas Fig. 6.

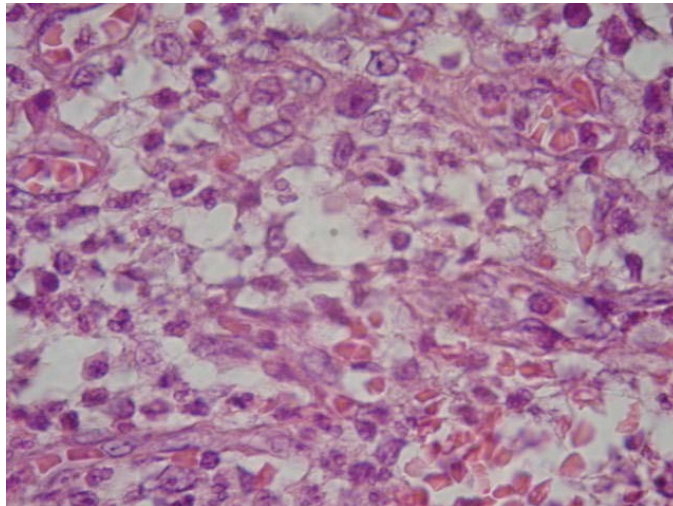


Fig. 6 Observamos infiltrado inflamatorio crónico periapical compatible Con Granuloma o periodontitis apical.

Patogénesis

La principal actividad fisiológica asociada con la periodontitis apical aguda son liberadas por sustancias biológicamente activas y cambios vasculares. El daño vascular dirigido a dañar o a matar a las células va a generar la liberación de enzimas intracelulares y de mediadores químicos de la inflamación como histamina, bradiquinina y metabolitos de ácido araquidónico.

La fuente de donde proceden estos mediadores químicos es variada, por ejemplo la histamina es liberada por la degranulación de los mastocitos, otra fuente de la histamina procede de descaboxilación de amino L-histidina de los tejidos. La bradiquinina es producto de gluco proteínas del plasma llamados kinogenos; este reacciona con otro grupo de enzimas proteolíticas y esterolíticas Kallikrein. La prostaglandinas son formadas después de una reacción compleja vía ciclo oxigenasa sendero de la cascada del ácido araquidonico (3), Tabla 1.

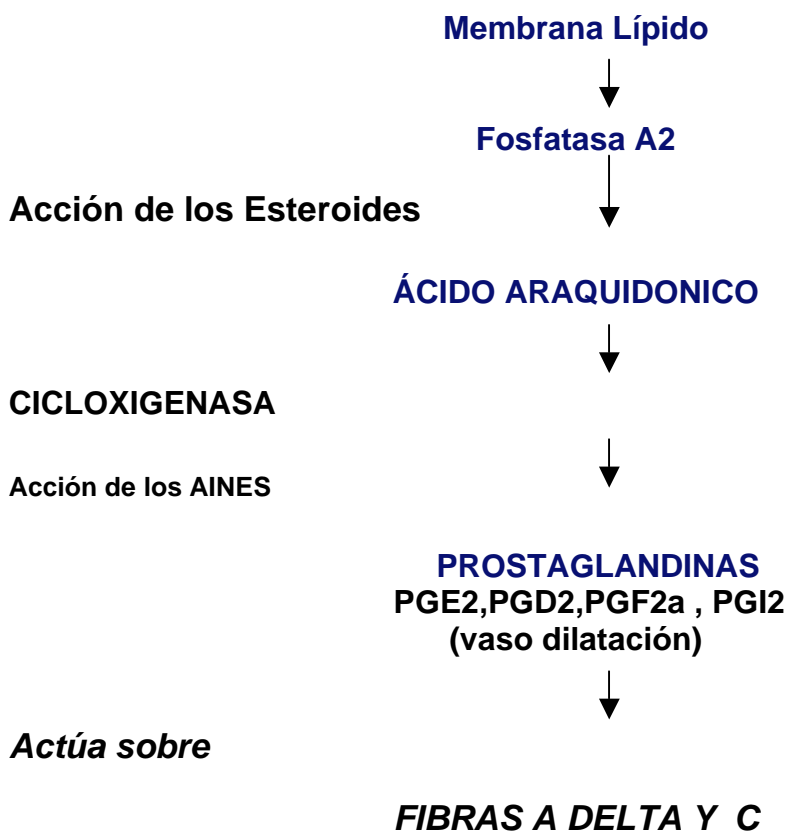


Tabla 1 Explica la vía de la Ciclooxygenasa en el proceso de inflamación y dolor. La liberación de las enzimas intracelulares histamina, bradiquinina y de metabolitos del ácido araquidonico en tejido periapical dañado provoca cambios microvasculares, incluyendo los que a continuación se mencionan: Vasodilatación y estasis, aumento de la permeabilidad vascular, exudado de

plasma y hemorragia, y la emigración de leucocitos polimorfonucleares y monocitos de la región post capilar hacia el tejido conectivo.

Teóricamente la respuesta es la misma cuando se presenta la reapesta antígeno-anticuerpo, solo que para que esta reacción se presente necesita existir una sensibilización previa del huésped y entonces un segundo desafío (4), con el mismo antígeno a través del sistema de conductos radiculares. Los cambios vasculares en una periodontid apical aguda mediada inmunologicamente será iniciada principalmente por el complemento fragmentados como C3a, C5 , y C567. Estos en su momento causan la degranulación de los mastocitos , resultando lo anteriormente descrito, la liberación de histamina y otros productos como serotonina, bradiquina etc.

A pesar de los agentes etológicas causantes la periodontitis apical aguda esta asociado con exudado de plasma y emigración de células inflamatorias de los vasos sanguíneos hacia la zona dañada. El plasma no solo diluye los materiales tóxicos presentes en la zona sino que también contienen anticuerpos que participan en la eliminación de los agentes irritantes.

Durante la fagocitosis Fig. 7, algunos leucocitos mueren y sus enzimas lisosomales son liberadas. Esta liberación de sustancias lisosomales también se liberan durante la fisiología normal de fagocitosis Fig. 8.

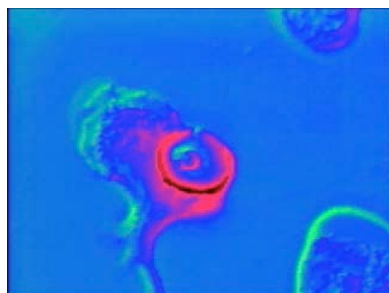


Fig. 7 Fagocitosis de una bacteria se observa la fase exposición oxidativa (cell Alive)



Fig. 8 Leucocito muerto de la virulencia bacteriana al no Poder fagocitarla (Cell Alive)

La colagenasa es una enzima con una actividad lisosomal potente , la liberación de esta enzima y de otras mas causan disolución y ruptura del ligamento periudontal y reabsorción del hueso alveolar.

Una lesión menor como puede ser la separación del ligamento periodontal con una lima endodoncica, puede generar una respuesta inflamatoria. Sin embargo una lesión mayor puede generar destrucción muerte, puede resultar como consecuencia de un proceso inflamatorio masivo en la zona periradicular. Aunque la dinámica de estas lesiones son escasamente conocidas, las consecuencias depende de el tipo de irritante grado de irritación y los mecanismos defensivos del huésped.

La mayoría de los mediadores químicos de la inflamación generan cambios vasculares, y algunos, como la bradiquinina también produce dolor (5, 6). Otras substancias como por ejemplo la prostaglandinas no solamente generan cambios vasculares durante la inflamación , pero potencializa la producción de dolor de otros mediadores químicos como el de la bradiquinina Tabla 1.

La liberación de mediadores químicos de la inflamación y su acción sobre las fibras nerviosas en los tejidos periradulares explica parcialmente la presencia de dolor

durante la periodontitis apical aguda. Esto se debe al poco espacio que existe por la expansión del ligamento periodontal aumenta la presión física intersticial que puede producir presión sobre las terminaciones nerviosas causando un dolor palpitante en la zona periradicular.

El aumento de presión puede ser más importante que la liberación de mediadores químicos de la inflamación en la generación de dolor periapical. El efecto de la presión de fluidos sobre el tejido periapical es comprensible cuando se abre un diente se libera a la presión y la disminución de dolor se presenta sin el uso de anestésicos. Sin embargo el papel exacto de los mediadores o de fluido en la generación de dolor es desconocido

Periodontitis Crónica

La periodontitis crónica se presenta a la presencia de un irritante por mucho tiempo generando una sintomatología moderada y lo más importante es la lisis del hueso esponjoso y cortical en la zona de irritación, esto se debe principalmente a la presencia de bacterias y de necrosis pulpar.

Desde el punto de vista clínico el paciente no reporta dolor y probablemente una sensibilidad a la masticación y percusiones, cuando el proceso inflamatorio atraviesa la cortical puede el paciente tener una sensación de palpitación en el área periapical y después la presencia de un trayecto fistuloso, todo esto asociado a una respuesta negativa al efectuar las pruebas de sensibilidad pulpar.

En este tipo de enfermedades el método de diagnóstico que más información nos da es la interpretación radiográfica, esto por que es posible observar una lesión periapical que significa la pérdida del ligamento periodontal, hueso esponjoso de hueso de la lamina dura, la periodontitis crónica ha sido clasificada histológicamente como

granuloma peripaical o quiste periradicular, desde el punto de vista clínico se han empleado muchos métodos para poder diferencia una lesión de la otra, pero el único método que nos puede ayudar a diferenciarlas es le examen histopatológico(8,).

Granuloma Periapical

La prevalencia de granuloma periapical en un estudio de la Universidad de Texas en San Antonio reveló que el 59.3% de las lesiones periapicales obtenidas depuse una cirugía periapical fueron granulomas, el 22% fueron quistes, el 12% tejido de cicatrización y 6.7 de otro tipo de patologías (9, 10).

El granuloma esta constituido principalmente tejido inflamatorio de granulación, con muchos vasos sanguíneos pequeños, fibroblastos, numerosas fibras de tejido conectivo, infiltrado inflamatorio y usualmente una cápsula de tejido conectivo.

El tejido conectivo va reemplazar al ligamento periodontal ya la hueso alveolar y en algunas ocasiones la cemento y dentina, este infiltrado inflamatorio esta compuesto por células plasmáticas, linfocitos, fagocitos mononucleares y muy ocasionalmente podemos observar la presencia de neutrofilios, también podemos observar en estas lesiones espacios parecidos a una aguja que son como consecuencia de cristales de colesterol, células foam y células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño, también se han podido detectar la presencia de fibras nerviosas (11), la presencia de proliferación epitelial esto hecho va ser común encontrarlo en la lesiones diagnosticadas como granuloma.(12)

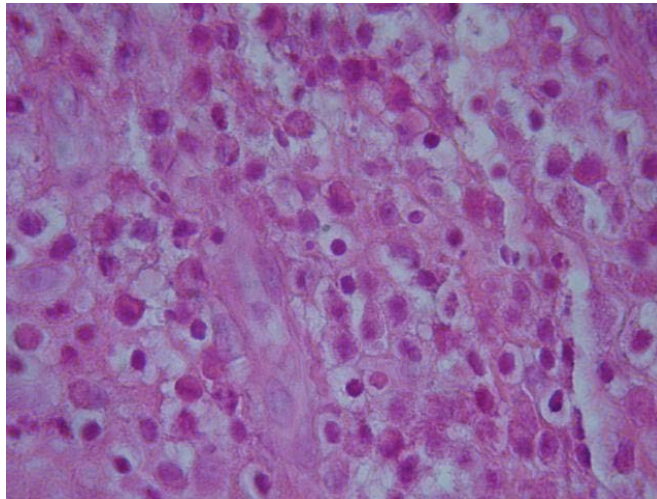


Fig. 9 granuloma Periapical

Quiste Periapical

En un análisis histopatológico del quiste periapical el lumen va estar rodeado por un epitelio escamoso estratificado, esta delineado se presenta usualmente incompleto o ulcerado, en el lumen de quiste periapical vamos a encontrar un fluido eusinofilo pálido ocasionalmente la presencia de detritus celulares. El tejido conectivo encontrado alrededor de quiste contiene elementos celulares y extracelulares son granuloma periapical y es posible encontrar células de inflamación en zona epitelial que delinea al quiste.

En el análisis histológico del quiste periapical son muy aparecidas al del granuloma excepto por la presencia de una cavidad central rodeada por epitelio c y en su interior un fluido semi-sólido.

Análisis Cuantitativo.

En un análisis de la composición de un granuloma periapical se ha demostrado que la presencia de las células de inflamación es mas del mitad de las células encontradas en el granuloma, entre las células inflamatorias encontramos a los macrófagos que son las mas importantes y así disminuyendo en cantidad encontramos a linfocitos, células plasmáticas y neutrofilos , cada una de estas células de la inflamación están implicadas en varios tipos de reacciones inmunológicas, en adición de estas células inmunocompetes otras características se han encontrado en la periodontitis apical crónica, estas características incluyen la presencia de antígenos en el conducto radicular demostrando la presencia de diferentes tipos de anticuerpos y de diferentes clases de células inmunocompetentes, que van a inducir a la destrucción de hueso. La inducción de lesiones apical a través de métodos inmunológicos se detecto complejos inmunes y la liberación de citocinas y respuesta a la presencia de necrosis y de bacterias esto sugiere que ambas respuesta humoral y la mediada por células están presentes en el desarrollo de la enfermedades periapicales.

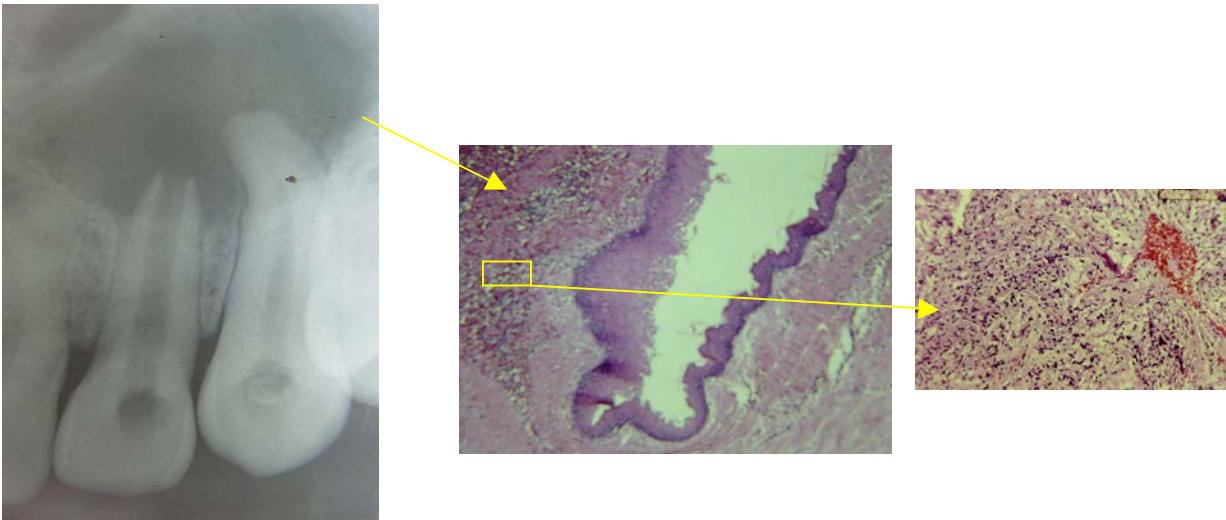


Fig. 10 Quiste Periapical (QP) y rodeando a la lesión quística tejido inflamatorio crónico (IC)

Referencias.

- 1.- Sundqvist G Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora (review). *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1994;78:522-530
- 2.- Okiji T, Kawashima N, Kobayashi C, Suda H. Distribution of Ia Antigen – expressing nonlymphoid cells various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J endodon* 1994;20:27-31
- 3.- Torabinejad M, and Bakland L.K. Prostaglandins their possible role in Pathogenesis of pulpal and periradicular diseases Part 1 *J Endodon* 1980;6:733-
- 4.- Torabinejad M and Kriger RD. Experimentally induced alterations in periradicular tissues of a cat *JDR* 1980;59-87
- 5.- Heard RH, Mellonig JT, Brunsvold MA, Lasho DJ, Meffert RM, Cochran DL. Clinical evaluation of wound healing following multiple exposures to enamel matrix protein derivative in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontol.* 2000 Nov;71(11):1715-21
- 6.- Sjöström S, Hansson L, Lerner UH. The bone resorbing activity released by gingival fibroblasts isolated from patients with periodontitis is independent of interleukin-1. *J Periodontal Res.* 2000 Apr;35(2):74-84.
- 7.- Duker J. Radiographic diagnostics. Radicular cyst. *Quintessence Int.* 2005 Apr;36(4):317
- 8.- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003 Jul;36(7):464-71.
- 9.- Sanchis JM, Penarrocha M, Bagan JV, Guarinos J, Vera F. Incidence of radicular cysts in a series of 125 chronic periapical lesions. Histopathologic study. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 1998 Feb;98(6):354-8
- 10.- Nobuhara WK, del Rio CE. Incidence of periradicular pathology in endodontic treatment failures *J Endodon* 1993;19:315
- 11.- Martinelli C, Rulli MA. The innervation of chronic inflammatory human periapical lesions. *Arch Oral Biol.* 1967 May;12(5):593-600
- 12.- Shafer W, Hine M, Levy B. A textbook of Oral Pathology. Philadelphia WB Sanders Co. 1974 pg 443
- 13.- Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J.* 1993 Mar;26(2):131-6.

14.- Grover N, Rao NN, Kotian MS. Evaluation of immunoglobulin G synthesizing plasma cells in periapical granuloma and cyst. Indian J Dent Res. 2001 Jan-Mar;12(1):35-9.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Erika P. Rendón-Huerta

Georgina Álvarez-Fernández

Todos los epitelios poseen dos características importantes: 1) la polaridad, por la cual se crean los dominios membranales apical y basolateral y 2) la integración estructural de una barrera entre dos compartimentos distintos (luminal y antiluminal), formada de cadenas de uniones intercelulares, denominadas uniones oclusoras o estrechas (UE) y en latín zonula occludens. Los diferentes componentes de las células epiteliales, como son sus proteínas de unión, receptores, transportadores y canales de calcio, así como los sistemas de secreción y endocitosis, dependen de estas dos características para llevar a cabo su función. Los procesos básicos como la absorción de sales y nutrientes y el balance de agua, no podrían ser realizados sin la polaridad que da direccionalidad y la presencia de las UEs, que mantienen esta polaridad y aseguran la difusión correcta de moléculas hacia el compartimiento adecuado.

ESTRUCTURA DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Todos los tejidos epiteliales están constituidos por una o mas capas de células polarizadas en las cuales se forman dos vías distintas para el flujo de iones y moléculas: la vía paracelular (regulada principalmente por las uniones estrechas) y la vía transcelular (Figura 1)



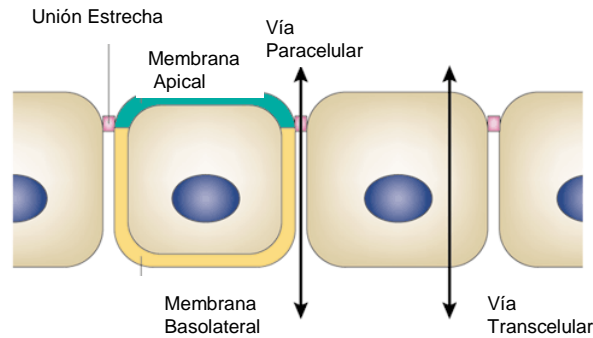


Figura 1. Diagrama que muestra las dos vías por las cuales se lleva a cabo el flujo de iones y moléculas en las células epiteliales: la vía paracelular, la cual es regulada principalmente por las uniones estrechas y la vía transcelular. Tomada de Tsukita S, Furuse M y Itoh M. 2001. *Nature Reviews* 2:285-293

La UE es la estructura más apical del complejo de uniones intercelulares (Fig. 2). Forma una barrera que delimita dos compartimentos extracelulares: el lumen y un espacio intercelular y controla el paso de iones y de moléculas a través de la vía paracelular (función de barrera), manteniendo una distribución polarizada de proteínas y lípidos en la membrana plasmática (1). La barrera creada por las UEs no es hermética, sino que presenta poros con distinta permeabilidad para cationes y solutos pequeños. La apertura o permeabilidad de estos poros puede ser regulada por distintas condiciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas (2).

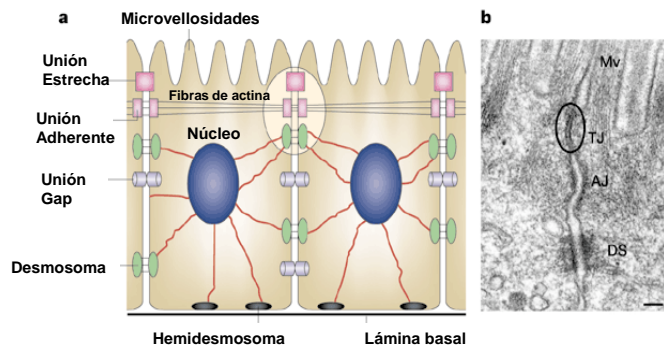


Figura 2. Uniones intercelulares. **a.** Diagrama que muestra células de epitelio intestinal. Las uniones estrechas están localizadas en la región más apical de las membranas laterales. **b.** Micrografía electrónica del complejo de unión en células epiteliales de ratón. Las uniones estrechas están indicadas en un círculo. Escala: 200 nm. Mv: microvellosidades; TJ: "tight junction" o unión estrecha; AJ: "Adherent junctions" o uniones adherentes; DS: desmosomas. Tomada de Tsukita S, Furuse M y Itoh M. 2001. *Nature Reviews* 2:285-293

La estructura de las UEs es característica y se puede observar en cortes finos analizados por microscopía electrónica. En estas condiciones las UEs se observan como una zona en la que las membranas plasmáticas están unidas íntimamente en ciertos puntos (3), llamados "kissing points", en los que el espacio intercelular se elimina completamente. En réplicas de criofracturas analizadas por microscopía electrónica de barrido, las UEs aparecen como una red de fibrillas que se

anastomosan y circundan el extremo apical de la membrana (4) (Figura 3).

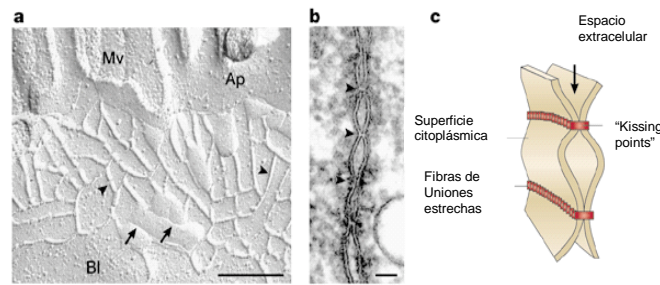


Figura 3. Estructura de las uniones estrechas. **a.** Imagen de microscopía electrónica de criofractura de células epiteliales de intestino. Las UEs aparecen como fibras (cabezas de flecha) en la cara P con surcos vacíos complementarios en la cara E (flechas largas). Mv: microvellosidades; Ap: membrana apical; Bl: membrana basolateral. Escala 200 nm. **b.** Micrografía electrónica de las UEs mostrando los "kissing points" (cabezas de flecha). Escala 50 nm. **c.** Esquema de la estructura tridimensional de las UEs. Una pequeña región de la membrana plasmática se asocia lateralmente con otra de la membrana de la célula adyacente cerrando el espacio intercelular.

Tomada de Tsukita S, Furuse M y Itoh M. 2001. *Nature Reviews* 2:285-293

El número de UEs así como su frecuencia varía de acuerdo al tipo celular. Dentro de la membrana plasmática, cada grupo de proteínas involucrado en la UE, se asocia lateralmente con las proteínas correspondientes de la UE en la membrana de la célula adyacente, eliminándose así el espacio intercelular en esta zona.

En las décadas de los 80's y los 90's, el uso de técnicas de microscopía electrónica de criofractura (5), inmunofluorescencia y "Western Blot", permitieron identificar varias proteínas integrantes de las UEs, siendo la primera de ellas ZO-1 (6). Posteriormente, se identificaron cingulina (7), ZO-2 (8), 7H6 (9), ZO-3(10), ocludina (11) y distintos tipos de claudinas (12). Estos hallazgos mostraron que las UEs son complejos de proteínas que, además, están asociados físicamente con las fibras de actina del citoesqueleto celular (13) (Figura 4).

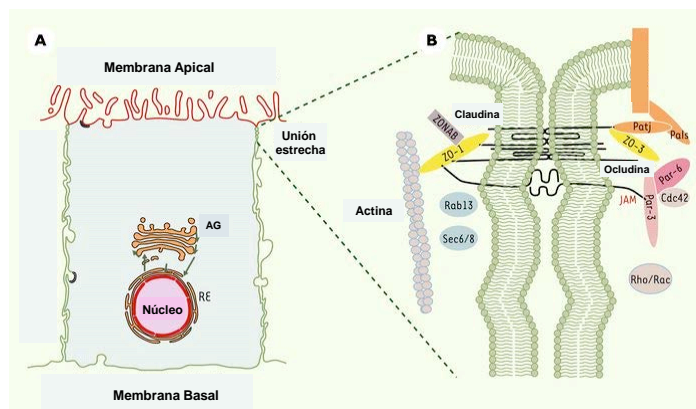


Figura 4. Organización de las proteínas de las uniones estrechas. A. Las uniones estrechas delimitan la membrana apical de la membrana basal en las células; RE: retículo endoplásmico; AG: Aparato de Golgi. B. Componentes y organización de los complejos proteicos que constituyen las uniones estrechas; ZO-1 a la -3: proteína zonula occludens; ZONAB: proteína asociada a los ácidos nucleicos; Rab13: proteína G pequeña; Sec 6/8: complejo de secreción; JAM: molécula de adhesión; Pals: proteína asociada con Lin7; Patj: pals asociada a la unión estrecha; Par-3 a la -6: proteínas acopladas a receptores; Cdc42: proteína 42 para el control de la división celular; rab, rho y rac: proteínas G pequeñas. Modificado de: "Les jonctions serrées Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires". Ahmed Zahraoui. Laboratoire de morphogenèse et signalisation cellulaires, CNRS UMR 144, Institut Curie, Paris, France.

ORGANIZACIÓN MOLECULAR DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Las proteínas que forman parte de las uniones estrechas se han clasificado de la siguiente manera: 1) proteínas integrales de membrana que constituyen las fibras de la UE, 2) proteínas citoplásmicas asociadas periféricamente, que "organizan" a las proteínas integrales de membrana y las conectan con filamentos de actina y/o a otras proteínas citoplásmicas y 3) proteínas de señalamiento que pueden estar involucradas en el ensamble de la unión y en la regulación de la barrera y de la transcripción de genes (Tabla 1).

TABLA I. COMPONENTES MOLECULARES DE LAS UNIONES ESTRECHAS

PROTEINAS	TAMAÑO (kDa)	PROTEINAS ASOCIADAS A LAS UEs	POSIBLES FUNCIONES
Proteínas integrales de membrana de UE			
Ocludina	60	ZO-1, ZO-2, ZO-3	Regular la función de barrera de la UE
Claudinas	20-27	ZO-1, ZO-2, ZO-3, MUPP1	Formación de las UEs, regulación selectiva de la permeabilidad
JAM	~45	ZO-1, PAR-3, MUPP1	Regulación de la polaridad
CAR	~46	ZO-1	?
P0	~25	N.D.	?
OAP-1	~30	Claudina-11	?
Proteínas citoplásmicas de las UEs que contienen dominios PDZ			
ZO-1	~220	Ocludina, Claudina, JAM, CAR, ZO-2, ZO-3, Cingulina, ZONAB	Formación de complejos moleculares
ZO-2	~160	Ocludina, Claudina, ZO-1,	Formación de complejos

ZO-3	~130	Cingulina Ocludina, Claudina, ZO-1, Cingulina	moleculares Formación de complejos moleculares Formación de complejos moleculares
PAR-3	~180	JAM, PAR-6, aPKC	Formación de complejos moleculares
PAR-6	~37	PAR-3, aPKC	Formación de complejos moleculares
MUPP1	~250	Claudina, JAM	Formación de complejos moleculares
Pals1	~70	PATJ	Formación de complejos moleculares
PATJ	~200	Pals1, ZO-3	Formación de complejos moleculares
MAGI-1	~130	N.D.	?
MAGI-2	~160	PTEN	?
MAGI-3	~125	PTEN	?
Otras proteínas citoplásmicas asociadas a la UE			
Cingulina	140-160	JAM, ZO-1, ZO-2	Unión de UEs a filamentos de actina
Antígeno 7H6	~155	N.D.	?
Simplekina	110-150	N.D.	?
Rab3B, Rab13	~25	N.D.	Transporte vesicular
JEAP	~100	N.D.	?
PILT	~85	N.D.	?
ZONAB	47-55	ZO-1	Regulación Transcripcional
huASH1	~330	N.D.	Regulación Transcripcional
aPKC (PKC [~])	~70	PAR-3	Regulación de la polaridad y ensamblaje de las UE
G i2	~40	N.D.	Regulación del ensamblaje de las UE
G 12	~40	ZO-1	Regulación del ensamblaje de las UE
PTEN	~54	MAGI-2	Fosfatasa, supresor tumoral

N.D.: No determinada

Tomada de Itoh M y Bissell MJ. (2004) *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 8(4):449-462

Proteínas integrales de membrana

Existen tres tipos de proteínas integrales de membrana bien caracterizados como componentes de las UEs: ocludina, claudinas y moléculas de adhesión asociadas a las UEs (Figura 5).

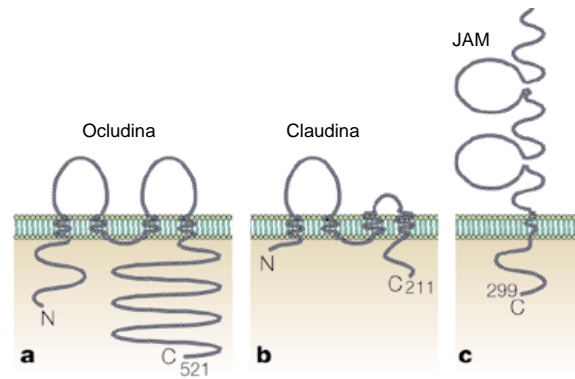


Figura 5. Proteínas integrales de membrana localizadas en las UEs. **a.** Ocludina esta constituida por cuatro dominios transmembranales y dos asas extracelulares. La primer asa está caracterizada por su alto contenido en residuos de glicina y tirosina. **b.** Claudina-1 también posee cuatro dominios transmembranales, pero no muestra similitud con ocludina. **c.** Molécula de adhesión la cual posee un dominio transmembranal y una región extracelular que se pliega en dos asas similares a las de las inmunoglobulinas.

Tomada de Tsukita S, Furuse M y Itoh M. 2001. *Nature Reviews* 2:285-293

Ocludina

Ocludina (~60 kDa) fue la primera molécula de las UEs identificada como una proteína integral de membrana (11). Su nombre proviene del latín “occludens” que significa cerrar u ocluir. Tiene cuatro dominios transmembranales, un extremo carboxilo terminal largo y un extremo amino terminal corto, ambos localizados en el citoplasma. Sus dos asas extracelulares son similares en tamaño y están enriquecidas en residuos de tirosina, de hecho, más de la mitad de los residuos en la primer asa extracelular son tirosinas y glicinas. El extremo carboxilo terminal de la ocludina interacciona *in vitro* con algunas proteínas que se asocian con la cara citosólica en la UE, por ejemplo ZO-1, ZO-2, ZO-3 y cingulina, así como con filamentos de actina (10, 14-17). La ocludina también se relaciona con proteínas que no están asociadas a la UE, como VAP-33, una proteína de función desconocida que interacciona con proteínas involucradas en la fusión de membranas durante el transporte vesicular.

La ocludina se considera como un marcador de las UEs, ya que estudios efectuados con anticuerpos específicos contra esta proteína muestran que está directamente incorporada a estas uniones. La sobre-expresión del gen de ocludina en células MDCK (Madin-Darby canine kidney) y la introducción de la ocludina truncada en su extremo carboxilo, en estas células o en células embrionarias de *Xenopus*, trae como consecuencia la elevación de la resistencia transepitelial (RTE), la alteración de la distribución polarizada de sus lípidos de membrana, así como un incremento en el flujo paracelular de moléculas pequeñas de elementos traza.

Por otro lado, los niveles de expresión de ocludina son proporcionales al número de UEs en diferentes tejidos, resaltando el papel de la ocludina como un componente esencial en este tipo de uniones. También se han identificado regiones específicas de

esta proteína con funciones importantes para las UEs. Experimentos utilizando una subclona de la línea celular A6 derivada de riñón de *Xenopus* incubadas con un péptido sintético correspondiente a la segunda asa extracelular de ocludina, redujo significativamente los niveles de expresión de ésta alterando las funciones de barrera en estas células (18). La disminución en la expresión de ocludina no se atribuyó a algún fenómeno de toxicidad o a un rompimiento general de los contactos célula-célula, ya que estas células conservaron una morfología normal y la localización de otros componentes de la UE no se alteró. En contraste, otros estudios utilizando células epiteliales provenientes de ratones modificados genéticamente para que no expresen ocludina, muestran que ésta proteína no es del todo indispensable para la formación de las UEs ya que en este caso, las células no mostraron ningún defecto estructural en estas uniones (19).

Claudinas.

La presencia de UEs en células que no expresan ocludina sugirió la existencia de otras proteínas integrales de membrana responsables de la formación de estas uniones. Las claudinas son una familia de proteínas que se llevó a cabo ya que estas precipitaban junto con ocludina en fracciones celulares insolubles en detergentes, obtenidas a partir de células de hígado de pollo (12). Sin embargo, no hay evidencia de una interacción directa entre ocludina y claudinas. Hasta ahora se han identificado por lo menos 24 tipos de claudinas, algunas de las cuales fueron clonadas y secuenciadas antes de la descripción de la claudina-1 y la claudina-2, aunque no se sabía que estaban directamente asociadas a las UEs. Las claudinas son proteínas de 20-27 kDa y a pesar de que no presentan una similitud en secuencia de aminoácidos con ocludina, las gráficas de hidrofobicidad sugieren que también ellas cruzan la membrana cuatro veces y exponen sus extremos carboxilo y amino al citosol. Las claudinas tienen dos asas extracelulares, una significativamente más grande que la otra y un extremo carboxilo muy corto. Los últimos aminoácidos de éste, están altamente conservados dentro de la familia de claudinas y constituyen motivos para la interacción con dominios PDZ de otras proteínas (20). Los dominios PDZ, son módulos de interacción proteína-proteína, que reconocen motivos de tres aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de proteínas transmembranales.

Diversos estudios han mostrado que las claudinas constituyen el esqueleto de las UEs; por ejemplo, claudinas expresadas exógenamente confirieron actividad de agregación celular a fibroblastos e iniciaron la formación de una gran red de

estructuras que se observaron como fibras de UEs concentradas en los sitios de contacto célula-célula (21). La ocludina por sí misma no puede reconstituir estas cadenas bien organizadas, pero cuando se introduce simultáneamente con claudinas en fibroblastos, ésta se incorpora en las cadenas reconstituidas con claudinas.

Los patrones de expresión de claudinas varían considerablemente entre los tejidos y algunos de ellos pueden provocar alteraciones en la reabsorción de ciertos iones. Por ejemplo, en el riñón se expresan por lo menos 12 genes de claudinas (22). Las claudinas-2, -10 y -11 se expresan en el segmento proximal del nefrón mientras que las claudinas -3 y -8 se expresan en el túbulo distal. En el asa de Henle ascendente, se expresan cuatro diferentes claudinas, las claudinas-3, -10, -11 y -16. En este sentido, resulta interesante la presencia de una mutación en el gen de claudina-16 en pacientes con el síndrome de hipomagnesemia, los cuales manifiestan un defecto selectivo en la reabsorción paracelular de Mg^{2+} en el asa de Henle ascendente (23). Además, se han encontrado mutaciones en claudinas asociadas a otras enfermedades hereditarias en humanos, como ocurre en pacientes que sufren de sordera recesiva autosómica, DFNB29, los cuales presentan mutaciones en el gen de claudina-14, la cual es expresada en el órgano de Corti en el oído interno (24).

Diversos estudios utilizando ratones que no expresan claudinas han proporcionado evidencia de que éstas juegan un papel importante en los procesos fisiológicos *in vivo* y de una manera específica en los tejidos. Por ejemplo, la claudina-5 se expresa de manera específica y en grandes cantidades en células endoteliales de cerebro, formando parte importante de la barrera entre neuronas y el torrente sanguíneo (25). La claudina-11 está localizada en las uniones de células de Sertoli y en las capas de mielina en el sistema nervioso central. Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión de claudina-1 en células epiteliales MDCK, provoca un incremento en la resistencia de las UEs (26), mientras que, experimentos realizados con ratones deficientes en esta claudina mueren después del primer día de nacidos mostrando serios defectos en la permeabilidad paracelular (27).

Sobre las bases de los descubrimientos de las medidas de permeabilidad electrofisiológica, Diamond y cols, plantearon la hipótesis de que en las UEs existían diferentes canales paracelulares (28). Décadas después, su hipótesis fue validada con experimentos *in vivo* e *in vitro* en los que se describe que las claudinas son canales paracelulares selectivos para iones específicos y que juegan un papel central en la regulación de la permeabilidad paracelular. Además, la diversidad de los patrones de expresión de las claudinas contribuye al mantenimiento de la homeostasis fisiológica en respuesta a las necesidades de cada tejido.

Molécula de Adhesión asociada a la UE (JAM)

La proteína JAM (de las iniciales en inglés *Junctional Adhesion Molecule*) es una glicoproteína localizada en las UEs de células epiteliales y endoteliales (28). JAM es una proteína que presenta un único dominio transmembranal y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su región extracelular se pliega en dos asas similares a las de las inmunoglobulinas unidas por puentes disulfuro. Además de participar en el ensamblaje de las UEs, la JAM está involucrada en la infiltración de los monocitos a través de las monocapas endoteliales, de manera espontánea o inducida por citocinas, tanto *in vitro* como *in vivo* (29-31).

Proteínas citoplásmicas

Se han identificado hasta la fecha alrededor de 30 moléculas como componentes citoplásmicos de las UEs, la mayor parte de las cuales son proteínas con dominios PDZ (Figura 6).

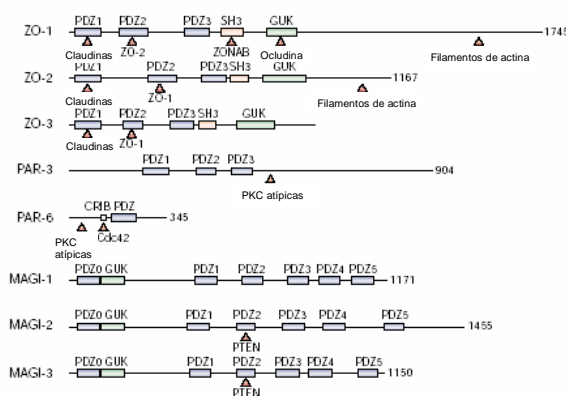


Figura 6. Proteínas con dominios PDZ localizadas en las UEs. Los dominios PDZ son representados por rectángulos cerrados y las regiones responsables de la asociación intermolecular son indicadas con flechas. Los números muestran las posiciones de los aminoácidos. GUK: dominio del tipo guanilato cinasa; MAGI: guanilato cinasa invertida asociada a la membrana; PKC: proteína cinasa C; PAR: proteínas necesarias para la polaridad celular en *C. elegans*; SH3: región 3 con homología a la proteína Src; PTEN: gen supresor de tumores.

Tomada de Tsukita S, Furuse M y Itoh M. 2001. *Nature Reviews* 2:285-293

La primera proteína citoplásmica de la UE que fue identificada fue denominada ZO-1 (*Zonula Occludens*) (32). La secuencia de esta proteína reveló que era homóloga a un supresor tumoral de células de insecto, *Disc large*, y a otra proteína localizada en las regiones submembranales de las sinapsis PSD-95/SAP 90 (33). Posteriormente se identificaron en las UEs otras dos proteínas similares a ZO-1 que se denominaron ZO-2 y ZO-3.

Las proteínas ZO son proteínas modulares que contienen algunos dominios

PDZ, un dominio SH3 y un dominio de homología con la enzima guanilato cinasa (GUK). Están involucradas en la generación y mantenimiento de dominios membranales especializados tales como las uniones intercelulares epiteliales y las uniones sinápticas (34). Estas proteínas adaptadoras pertenecen a la familia MAGUK (del inglés *Membrane-Associated Guanylate Kinase*) y actúan como puentes para unir a las proteínas que constituyen las fibrillas de la UE con la actina. A la fecha han sido localizadas tres proteínas ZOs en la superficie citoplásmica de las UEs.

ZO-1 (de 220 kDa) contiene tres dominios PDZ, un dominio SH3, un dominio GUK en su mitad amino terminal y un dominio rico en prolina en su mitad carboxilo terminal. En células epiteliales ZO-1 está concentrada exclusivamente en las UEs. Su distribución espacial puede ser parcialmente explicada por la afinidad que su extremo amino terminal tiene para interactuar con el extremo carboxilo terminal de la ocludina y el extremo carboxilo terminal de la β -catenina. Sin embargo, todavía no está claro por qué en células completamente polarizadas ZO-1 está concentrada solo en las UEs y no en las uniones adherentes, en donde la β -catenina está concentrada (35).

El extremo carboxilo terminal de ZO-1 está directamente asociado con filamentos de actina. Por ello, se ha propuesto que ZO-1 podría entrecruzar a los filamentos de actina con la ocludina presente en las UEs o formar un complejo β -catenina-caderina en las uniones adherentes. Se ha sugerido que esta función de entrecruzamiento de ZO-1 está involucrada en la regulación de las funciones de las UEs en células epiteliales, así como en la adhesión celular basada en caderinas en fibroblastos (36).

ZO-2 (160kDa) también contiene tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK en su extremo amino terminal seguido por un dominio rico en prolina en su extremo carboxilo terminal (37). Inicialmente, a diferencia de ZO-1, ZO-2 fue reportada ser específica de las UEs. Sin embargo, análisis recientes indican claramente que esta proteína no solo está concentrada en las UEs de células epiteliales, sino que también se encuentran concentradas en las uniones adherentes de células no epiteliales. Además, se ha reportado que ZO-2 entrecruza con ocludina o β -catenina en filamentos de actina y que el segundo dominio PDZ de ZO-2 se une a ZO-1 para formar heterodímeros.

Proteínas citoplásmicas que no pertenecen a la familia MAGUK

Otros componentes citoplásmicos de las UEs, los cuales no poseen dominios PDZ, parecen jugar un papel importante en otras funciones tales como la regulación

del tráfico vesicular y la contractibilidad del esqueleto de actina. Sin embargo, la función precisa de muchos de estos componentes es todavía desconocida.

Proteínas de señalamiento

Se han identificado algunas moléculas de señalamiento involucradas en la regulación del ensamble y desensamble de las UEs, muchas de ellas a partir de estudios farmacológicos utilizando activadores o inhibidores específicos.

Proteína cinasa A

Se ha observado que la elevación del AMPc, el cual activa a la proteína cinasa A (PKA), promueve la función de la barrera epitelial. El tratamiento de células con H-89, un inhibidor específico de PKA, retarda la recuperación de la función de barrera después de un pulso de Ca^{2+} , el cual es utilizado para modificar el ensamble y desensamble de los contactos célula-célula cambiando la concentración del Ca^{2+} extracelular (38). Aunque algunos estudios indican que la reorganización del citoesqueleto regula la función de la PKA sobre las UEs, el mecanismo molecular de este proceso, así como su significado fisiológico aún no ha sido dilucidado.

Proteína Cinasa C

La proteína cinasa C (PKC) pertenece a una familia de cinasas de residuos serina-treonina que constituye una parte integral del sistema de transducción de señales hormonales y es parte del sistema de transducción acoplado a fosfolipasa C. Hasta la fecha, se han identificado 11 isoformas de PKC en células de mamífero y éstas a su vez están clasificadas en tres grupos de acuerdo a su estructura y a su regulación: 1) las convencionales (cPKC): α , β , I, II, y γ , que son reguladas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y Ca^{2+} ; 2) las nuevas (nPKC): δ , ϵ , ζ , y η , reguladas por DAG y PS y 3) las atípicas (aPKC): θ y ξ cuya regulación no ha sido claramente establecida, aunque su actividad es estimulada por PS.

Diversos estudios en los que se han utilizado diferentes activadores e inhibidores de las PKCs han aportado evidencias de que éstas regulan la dinámica de formación y/o la permeabilidad de las UEs. Por ejemplo, se ha demostrado que los ésteres de forbol y el DAG, dos potentes activadores de cPKC y nPKC, modulan el ensamble de las UEs en cultivos de células epiteliales. Por otra parte, al inducir el aumento de la expresión de construcciones estables de PKC- transfectadas en células epiteliales LLC-PK1 y someterlas al tratamiento con ésteres de forbol, se observó un aumento notable en la permeabilidad de las UEs, así como una mayor

adhesión con las células vecinas. Experimentos similares efectuados con PKC- δ , mostraron un aumento en la permeabilidad de las UEs, así como cambios estructurales en las mismas, aún en ausencia de ésteres de forbol (39).

También se han realizado estudios en células MDKC II para analizar la importancia funcional de las α PKC en la polaridad epitelial, utilizando un vector de expresión de adenovirus. Uno de estos estudios mostró que una mutante con efecto dominante negativo de α PKC bloquea la formación de las UEs después de un pulso de Ca^{2+} o durante el crecimiento normal de las células. El aumento de la expresión de esta mutante desestabilizó la barrera y la polaridad de las UEs e impidió la acumulación de sus componentes en los sitios de contacto célula-célula. Este efecto se ha observado únicamente antes de que se complete la formación de las UEs, lo que sugiere que la actividad de cinasa de las α PKCs probablemente se requiera durante el establecimiento dinámico de las estructuras de unión y de la polaridad de las células epiteliales (40).

Proteínas G heterotriméricas

Se ha mostrado que el tratamiento de células con AIF4, un conocido activador de las subunidades β de proteínas G heterotriméricas (G β) incrementa la función de barrera de las UEs (41). Algunos miembros de la familia G β se expresan en células epiteliales, entre ellos G β_{i2} y G β_{12} que se localizan en los contactos célula-célula cercanos a la UE. La sobreexpresión de G β_{i2} disminuye la permeabilidad paracelular. Por otro lado, G β_{12} , la cual se asocia con ZO-1, incrementa la permeabilidad cuando se sobreexpresa en células epiteliales. Todavía no está claro cómo diferentes tipos de proteínas G β regulan la función de las UEs en vías opuestas, sin embargo, estos estudios muestran que las subunidades G β pueden regular la función de estas uniones.

FUNCIONES DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Función de Barrera y Homeostasis en los tejidos

La función de barrera de las UEs es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis en diferentes tejidos. En tejidos epiteliales, la función de barrera regula el transporte entre la interface de la mucosa y el medio ambiente externo. In vivo el flujo paracelular a través del epitelio está estrictamente controlado por las UEs adaptando la permeabilidad de iones o moléculas a las necesidades fisiológicas de cada sistema. En el intestino, las uniones estrechas juegan un papel muy importante en los mecanismos de defensa del huésped (42). Muchos patógenos incluyendo bacterias y

virus alteran las UEs durante las infecciones. Recientemente se mostró que algunos patógenos se unen y modifican directamente a los componentes de las UEs o ejercen su efecto a través del citoesqueleto de actina, el cual se asocia con la superficie citoplásmica de las UEs. Un ejemplo es la proteína CagA de *Helicobacter pylori*, la cual se asocia con la proteína ZO-1 causando un ensamblaje ectópico de los componentes de las UEs en los sitios en los que se une la bacteria, alterando así la composición y función del complejo de unión apical (43). La liberación prolongada de CagA en epitelios polarizados causa un mal funcionamiento de la barrera epitelial y produce alteraciones graves en la morfología celular del epitelio.

En algunos tejidos como cerebro y testículos, la función de barrera está ampliamente desarrollada. La barrera entre células neuronales y el torrente sanguíneo protege al cerebro de la entrada de diversos materiales dañinos circulantes en la sangre, disminuyendo al mínimo su entrada al intersticio del tejido cerebral (44). En los testículos, la función de barrera crea un microambiente especializado para el desarrollo de las células germinales ya que estas células no tienen acceso a la circulación sistémica durante su desarrollo (45). Además de que estas barreras ampliamente desarrolladas ayudan al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos, modulan también el tránsito de drogas terapéuticas, especialmente aquellas que entran al sistema nervioso central. Es por ello que se ha incrementado el interés en la investigación para desarrollar técnicas y procedimientos que permitan la distribución eficiente de drogas (46).

Función de barrera y polaridad celular

Se ha demostrado que las UEs funcionan como una barrera intramembranal, es decir, restringiendo el flujo de lípidos y de proteínas de la membrana plasmática a través de los dominios de membrana apical y basolateral (47), por lo que se ha propuesto que dichas uniones están involucradas de manera importante en la regulación de la polaridad celular. Si bien las bases estructurales y moleculares de la barrera de difusión intramembranal son todavía difíciles de describir, estudios recientes utilizando mutantes de *Drosophila* que poseen defectos en la polaridad celular, apoyan la idea de que los componentes de las UEs juegan un papel importante en el establecimiento de la polaridad epitelial (48, 49). En *Drosophila*, se han identificado tres complejos moleculares que regulan la polaridad celular. El primer complejo está constituido por *Bazooka* (*Baz*), *Dm-Par6* y *Da-PKC* (una proteína cinasa C atípica de *Drosophila*). Las proteínas integrales de membrana *Crumbs* (*Crb*) y sus proteínas asociadas *Stardust* (*Sdt*) y *Disc Lost* (*Dlt*) forman el segundo complejo y, el

tercer complejo, está constituido por *Scribble (Scrib)*, *Disc Large (Dlg)* y *Lethal Giant Larvae (Lgl)*. En *Drosophila* el epitelio embrionario carente de *Baz*, *Dm-Par6* y *DaPKC* muestra una alteración de la polaridad apico-basal. Las mutantes que han perdido la expresión de *Crb*, *Sdt* o *Dlt* muestran un fenotipo similar, lo que parece indicar que *Crb* funciona como un determinante apical en el epitelio de *Drosophila*.

Los homólogos de estos tres genes de polaridad están presentes en vertebrados y dos de ellos *Baz*, *Dm-Par6* / *DaPKC* y *Crb/Sdt/Dlt* están localizados en las UEs de los epitelios. Hay una gran variedad de cada uno de los homólogos de determinantes de polaridad en *Drosophila* y cada uno de ellos está subdividido en familias de proteínas, indicando que los mecanismos moleculares que regulan la polaridad celular son más complejos en los organismos superiores.

Regulación Transcripcional, Proliferación y Diferenciación Celular

Se ha sugerido que algunos componentes de las UEs juegan un papel importante en la regulación de la expresión de génica. Algunas proteínas se translocan de las UEs al núcleo y se unen a factores transcripcionales específicos o funcionan por sí mismas como factores de transcripción. Por ejemplo, en vertebrados, ASH1 humana (huASH1) fue identificada como un homólogo de *Ash1* de *Drosophila*, un factor transcripcional que está involucrado en la expresión de algunos genes homeóticos (50). huASH1 se localiza en las UEs y en el núcleo y se ha especulado que transduce la señalización mediada por mecanismos de adhesión desde las UEs al núcleo. La proteína de unión a ácidos nucleicos asociada a ZO-1 (ZONAB) contiene la secuencia consenso de un factor transcripcional tipo Y-BOX (51). En células confluentes en cultivo, ZONAB está asociada a las proteínas citoplásmicas de las UE(s), pero en células en cultivo a baja confluencia, se observa concentrada en el núcleo y se asocia también con la región del promotor de dos reguladores de la proliferación celular: *ErbB2* y *CDK4*.

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

En los últimos años, la identificación de los principales componentes de las uniones estrechas ha permitido tener una mayor integración de las observaciones morfológicas y fisiológicas que se tienen de estas estructuras. En este trabajo se han descrito las características estructurales de estas uniones y se han discutido algunas de sus funciones a nivel molecular.

La identificación de ocludina y claudinas ha originado un gran número de preguntas acerca de la estructura de las UEs, por ejemplo ¿cómo se organizan

occludina y las diferentes claudinas en las UEs? ¿se requiere de algunos lípidos en particular para la organización de las UEs? ¿cómo pueden restringir la difusión lateral de los lípidos exclusivamente a la membrana apical?

Por otra parte, a nivel celular existe gran interés por estudiar más a fondo cuál es la relación entre las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas; así como la forma en que se integran occludina, claudinas, cadherinas y sus moléculas asociadas en estos complejos de unión durante la polarización del epitelio.

La función de barrera de las UEs se regula de manera coordinada y selectiva de acuerdo a los requerimientos de los diferentes tejidos. Sin embargo, la información que se tiene hasta ahora de los mecanismos moleculares que participan en esta función es incompleta, aunque se propone que en la regulación del funcionamiento de las UEs las vías de señalización implicadas actúan a través de mecanismos ya conocidos como la fosforilación en residuos de tirosina y serina o treonina o la activación de diferentes tipos de proteínas G.

Finalmente, otro aspecto importante en el estudio de la UEs consiste en determinar el papel que juegan en distintas entidades patológicas, así como la participación de occludina y las diferentes claudinas en los procesos tumorales.

A pesar de la existencia de múltiples estudios relacionados con las UEs, el panorama de su estructura molecular y los mecanismos de regulación de sus funciones es todavía incompleto. Por lo tanto, hace falta identificar y caracterizar otros componentes importantes de la UEs, así como determinar cuál es la relevancia fisiológica de su regulación en tejidos normales y malignos, tratando de identificar las diversas vías de señalización involucradas en estos procesos.

Referencias.

- 1) Diamond J (1977) The epithelial tight junctions: bridge, gate and fence. *Physiologist* 20:10-18
- 2) Goodenough DA y Wong V (1999) Paracellular channels! *Science* 285:62
- 3) Farquar MG y Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:147-156
- 4) Staehelin LA (1973) Further observations of the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J cell Sci* 13:763-786
- 5) Pinto da Silva P y Kachar B (1982) On tight-junction structure. *Cell* 28(3):441-50
- 6) Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS y Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junctions (Zonula Occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766
- 7) Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B y Kendrick-Jones J (1988) Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333(6170):272-6
- 8) Jesaitis LA y Goodenough DA (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* 124(6):949-61
- 9) Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K y Mori M (1993) Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120(2):477-83
- 10) Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J y Stevenson BR (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141(1):199-208
- 11) Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S y Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-88
- 12) Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K y Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141(7):1539-50
- 13) Madara JL, Stafford J, Barenberg D y Carlson S (1988) Functional coupling of tight junctions and microfilaments in T84 monolayers. *Am J Physiol* 254 (3 Pt 1):G416-23

- 14) Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S y Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127:1617-1626
- 15) Fanning AS y Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the membrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753
- 16) Cordenonsi M, Turc F, D'Atri F, Hammar E, Martinucci G, Meggio F, Citi S (1999) *Xenopus leavis* occludin. Identification of in vitro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin. *Eur J Biochem* 264:374-384
- 17) Wittchen ES, Haskins J y Stevenson BR (1999) Protein Interactions at the tight junction: actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274:35179-35185
- 18) Wong V (1997) Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* 273:C1859-C1867
- 19) Saitou M, Fujimoto Y, Doi M, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T y Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408
- 20) Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K y Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401
- 21) Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y y Tsukita S. (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13:875-886
- 22) Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S y Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285:103-106
- 23) Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Plopis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ y Friedman TB (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-172
- 24) Morita K, Sasaki H, Furuse M y Tsukita S (1999) Endothelial claudin: Claudin-5/TM6CF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194
- 25) Inai T, Kobayashi J y Shibata Y (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78:849-855

- 26) Furuse M, Furuse K, Sasaki H y Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153(2):263-72
- 27) Diamond JM (1978) Channels in epithelial cell membranes and junctions. *Fed Proc* 37:2639-2643
- 28) Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons T y Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that contributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127
- 29) Bazzoni G, Martín-Estrada F, Mueller P, Nelboeck P, Schmid T, Bartfai E, Dejana E y Brockhaus M (2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 275:30970-30976
- 30) Liu Y, Nustrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M y Parkos CA (2000) Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113:2363-2374
- 31) Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS y Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junctions (Zonula Occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766
- 32) Willot E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van-Itallie C y Anderson JM (1993) The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7834-7838
- 33) Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ (1997) PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19:469-479
- 34) Ando-Akatzuka Y, Yonemura S, Itoh M, Furuse M y Tsukita S (1999) Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial polarity. *J Cell Physiol* 179:115-125
- 35) Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S y Tsukita S (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138:181-192
- 36) 26, 40 Tzukita Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6:382-384
- 37) Itoh M, Morita K y Tsukita S. (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight and adherent junctions with a binding affinity to occludin and α catenin. *J Biol Chem* 274:5981-5986

- 38) Klingler C, Kniesel U, Damforth SD, Wolburg H, Engelhardt B y Risau W (2000) Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol* 113(5):349-61
- 39) Clarke H, Marano C W, Peralta Soler A y Mullin J M (2000) Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv Drug Del Ref* 41: 283-301
- 40) Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T y Ohno S (2001) Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* 152:1183-1196
- 41) Denker BM, Saha C, Khawaja y Nigam SK (1996) Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis *J Biol Chem* 271:25750-25753
- 42) Baumgart DC y Dignass AU (2002) Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin Nutr Metab Care* 5:685-694
- 43) Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ y Falkow S (2003) Disruption of the epithelial apical-junction complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300:1430-1434
- 44) Staddon JM y Rubin LL (1996) Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol* 6:622-627
- 45) Holash JA, Harik SI, Perry G y Stewart PA (1993) Barrier properties of testis microvessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11069-11073
- 46) Scherrmann JM (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 38:349-354
- 47) Spring KR (1998) Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol* 60:105-119
- 48) Bilder D (2001) PDZ proteins and polarity functions from the fly. *Trends Genet* 17:511-519
- 49) Tepass U, Tanentzapf G, Ward R y Fehon R (2001) Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 35:747-784
- 50) Nakamura T, Blechman J, Tada S, Rozovskaia T, Itoyama T, Bullrich F, Mazo A, Croce CM, Geiger B y Canaani E (2000) huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila* ash1 gene, localizes to both nuclei and cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7284-7289
- 51) Balda MS y Matter K (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19:2024-2033

Las Endotoxinas y su papel en la enfermedad periodontal

Gloria Gutiérrez Venegas, Santa Rita Arroyo-Cruz, Perla Kawasaki-Cárdenas, Miguel Pérez-Garzón y Silvia Maldonado-Frías.

El periodonto en términos generales es la estructura que protege, sostiene y mantiene al diente dentro de su alveolo. Anatómicamente está integrado por la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. El periodonto también llamado aparato de inserción o tejidos de sostén del diente establece una unidad funcional, biológica y evolutiva que experimenta algunas modificaciones con la edad y además está sujeta a alteraciones morfológicas y funcionales, así como a alteraciones del medio bucal (1). (Fig. 1)

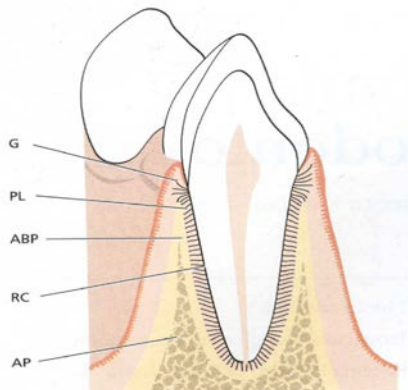


Fig.1 Dibujo esquemático del diente con su periodonto: la encía (G), el ligamento periodontal (PL), el cemento radicular (RC) y el hueso alveolar es decir el hueso alveolar propio (ABP) y la apófisis alveolar (AP). Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang.

Encía.

Es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Adquiere su forma y textura final con la erupción de los dientes.

En sentido coronario, la encía que presenta una coloración de rosada a coral termina en el margen gingival libre, que tiene un contorno festoneado, en

sentido apical la encía se continúa con la mucosa alveolar de la cual se encuentra separada por la línea mucogingival.

La encía normal se caracteriza clínicamente por su color rosado y consistencia firme. La encía es un tejido que cuenta con muchas regiones y funciones especializadas. (fig 2) (1,2)



Fig.2 Fotografía de una encía. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang.

ENFERMEDAD PERIODONTAL

Los padecimientos más frecuentes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y del aparato de inserción dental, son infecciones causadas por microorganismos relacionados con la acumulación local de placa dental, cálculos y flora periodontal patógena subgingival.(2)

(Fig.3)

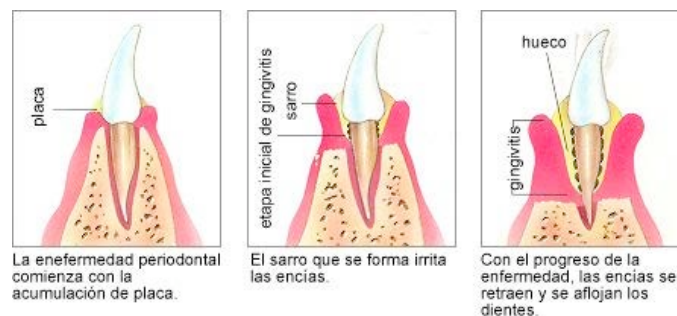


Fig.3 Evolución de la enfermedad Periodontal.

La gingivitis y la periodontitis son enfermedades que pueden contraer personas aparentemente sanas y son estos los trastornos periodontales más frecuentes (2)

La gingivitis es un proceso inflamatorio de la encía, en la cual el epitelio de unión se conserva íntegro pese a tener modificaciones por la enfermedad. Se habla de periodontitis o enfermedad periodontal cuando se pierde tanto la inserción del ligamento periodontal, como el soporte óseo alveolar, es decir cuando existe una bolsa periodontal (al sondeo más allá de los 3 mm que se consideran normales dentro del surco dentogingival).

Los padecimientos y otras anormalidades en los tejidos periodontales se pueden clasificar según Genco de la siguiente forma: (2)

- I. Enfermedades y trastornos gingivales
 - A. Gingivitis (sin complicaciones sistémicas)
 - B. Gingivitis y alteraciones gingivales con complicaciones sistémicas
 - C. Alteraciones gingivales diversas
- II. Enfermedades y trastornos periodontales
 - A. Periodontitis del adulto sin complicaciones sistémicas
 - B. Periodontitis juvenil
 - C. Periodontitis con complicaciones sistémicas.
 - D. Trastornos diversos que afectan al periodonto
- III. Cambios periodontales relacionados con traumatismo oclusal
 - A. Traumatismo oclusal primario: movilidad y otras alteraciones periodontales relacionadas con bruxismo y otros hábitos parafuncionales

- B. Traumatismo oclusal secundario: movilidad y otras alteraciones periodontales relacionadas con fuerzas normales en un periodonto gravemente dañado

Cada uno de los distintos tipos de enfermedad periodontal se han relacionado con diversos microorganismos específicos. Un ejemplo de esto es la periodontitis juvenil, la cual se caracteriza por ser de avance rápido, lo que la convierte en una enfermedad muy agresiva, se considera así mismo que el agente causal es *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Las enfermedades periodontales, como ya mencionamos en líneas anteriores, son causadas por bacterias presentes en la placa dental bacteriana, esto se debe que es una enfermedad infecciosa. La enfermedad periodontal esta asociada con una microflora compleja en la cual se han identificado más de 350 especies. Los microorganismos predominantemente son los gram-negativos, facultativos o anaerobios y móviles, entre las especies asociadas a la enfermedad periodontal se encuentran: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*.

Los lipopolisacáridos (LPS), llamados también endotoxinas, son los componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias gram-negativas y entre sus funciones preponderantes está la participación en el mantenimiento e integridad de estos microorganismos son además las moléculas responsables del choque séptico.(3,4)

Es bien sabido que el LPS es un mediador inflamatorio, de gran importancia para la comprensión en el desarrollo de la gingivitis y de la enfermedad periodontal.

LPS puede penetrar en todos los tejidos gingivales (5-8) y de esta forma interactuar con todos los tipos celulares de la encía y comenzar de esta forma un amplio espectro de procesos dañinos. El reto de los hospederos es que deber discernir entre los numerosos tipos de LPS y responder de forma adecuada a su presencia.

El papel del LPS en la regulación y expresión de los mediadores inflamatorios no ha sido completamente esclarecido, pero basado en sus acciones como mediador inflamatorio y a los cambios asociados con la enfermedad, es sin duda un componente fundamental en la transición del estado de salud al de la enfermedad.

Composición y estructura de los lipopolisacáridos orales

Los LPS están formados por cuatro dominios, a saber: el lípido A, que es la región tóxica de la molécula, el núcleo interno de oligosacáridos, el núcleo externo y la región polisacárida O-antigénica. Las formas moleculares de los LPS predominantes en las especies periodontopatógenas presentan un lípido A bastante conservado, que consiste en una molécula de β -(1,6)-D-glucosamina (1,4') disacárido fosfato, una de ácido dodecanoico 3'-hidroxilado y una de tetradecanoico unido en posiciones 2' y 3' a moléculas de ácido graso hidroxilado (Fig. 4). El lípido A está unido a un núcleo interno que contiene L-glicero-D-mano-heptosa y ácido ceto-deoxi-octulosónico (KDO) y una región menos conservada en el núcleo externo compuesta de azúcares como glucosa, galactosa, manosa y glucosamina. La molécula O-polisacárida, que está unida al núcleo externo, varía ampliamente en composición y estructura, aún entre las mismas especies.

Estructura del lípido A obtenido de bacterias orales

El lípido A presente en LPS obtenido de bacterias orales presenta el mismo tipo de estructura que el de las enterobacterias, consistente en β -(1,6)-glucosamina disacárido fosfato sustituida con ácidos grasos hidroxilados (9). La estructura del lípido A más ampliamente caracterizada corresponde a la de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos presentan una estructura de lípido A que es similar a la que forma parte del LPS de *Escherichia coli* y difieren únicamente en la sustitución de dodecanato por una molécula tetradecanato (Fig 2). El lípido A de los LPS de *P. gingivalis*, presenta un menor número de cadenas de ácido graso unidas mediante un enlace β -(1,6) glucosamina y es de mayor longitud en comparación al lípido A de *A. actinomycetemcomitans*, que se encuentra fosforilado en el átomo de carbono 1 del azúcar (9-15).

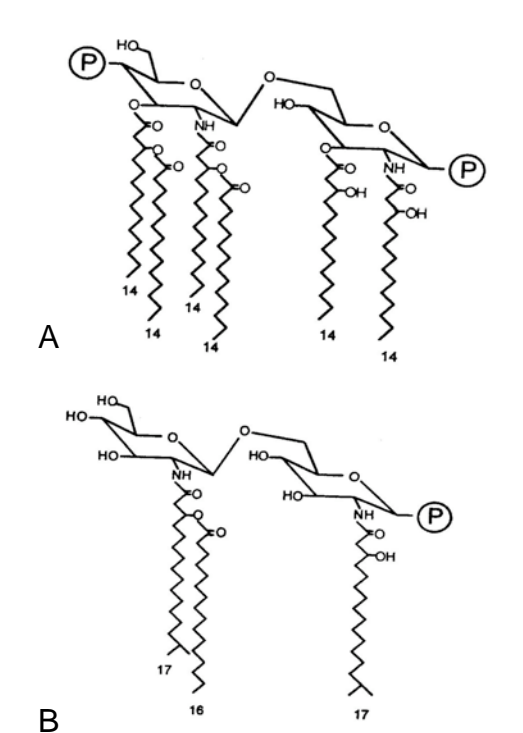


Figura 4. Estructura química del lípido A
A) *A. actinomycetemcomitans*. B) *P. gingivalis*.

Los LPS aislados de organismos gram-negativos, están compuestos de especies moleculares múltiples, que difieren no sólo en la presencia o cantidad de O-polisacáridos unidos en el núcleo externo sino también en la composición del lípido A.

Efecto de los lipopolisacáridos sobre las células del parodonto

La distribución de los leucocitos en los tejidos gingivales aumenta cuando las bacterias, proteínas y LPS son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos (Fig. 3). De igual forma las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los LPS en el parodonto, liberan interleucina-1 (IL-1) (16).

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan tanto IL-8 como la proteína quimotáctica monocítica (MCP-1). Se ha demostrado de la misma forma, que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas, la respuesta a la producción de IL-8 disminuye cuando se tratan a estas células con LPS extraídos de *P. gingivalis*.

Como se mencionó anteriormente los monocitos, son capaces de responder a concentraciones muy bajas de LPS produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como los linfocitos y los osteoclastos.

De igual forma, los neutrófilos liberan citocinas en respuesta al tratamiento con LPS, en particular los extraídos de *P. gingivalis* y *Capnocytophaga ochracea* que son capaces de estimular la producción de IL-1, IL-8 y TNF- α en estas células. (16-18)

En los macrófagos los LPS promueven la síntesis de IL-1 β , que a su vez estimula a las células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) a

secretar prostaglandinas y metaloproteinasas mismas que se encuentran en altas concentraciones en los tejidos periodontales y en particular en el fluido cervical (el surco gingival contiene un fluido cuya función es la limpieza del surco, entre sus funciones se encuentra el aumento de la adhesión del epitelio al diente y tiene propiedades antibacterianas), con lo que se inicia la destrucción ósea y de tejidos de soporte como el ligamento periodontal.

De los mediadores de los procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado es IL-1, entre cuyos efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E₂ (PGE₂) por parte de los fibroblastos gingivales y de los monocitos (19-23).

Los monocitos son la fuente principal de secreción de TNF- α en respuesta a LPS. El TNF- α estimula la resorción ósea pero es menos potente que la IL-1. Incrementa de este modo la permeabilidad vascular, la degranulación de neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación de PGE₂ por los fibroblastos y de IL-1 por monocitos. En el fluido crevicular los niveles de PGE₂, se incrementan durante procesos inflamatorios. Se ha determinado que el tratamiento con agentes anti-inflamatorios permite interferir con la síntesis de ciclooxigenasas, disminuye el proceso destructivo lo que nos sugiere que la PGE₂ participa de manera importante en la enfermedad parodontal.

En lo que se refiere a las proteínas de matriz, como las metaloproteinasas (MMP), que consisten al menos de nueve endopeptidasas dependientes de zinc, se ha establecido que participan en la destrucción del tejido conjuntivo y en la resorción ósea. Los LPS presentes en la cavidad oral pueden estimular a

los macrófagos para secretar MMP que participan en la destrucción tanto de tejidos blandos como óseos.

Receptores de los Lipopolisacáridos.

Entre las funciones de los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos consiste en el rápido reconocimiento de diversos patógenos así como la respuesta antimicrobiana.

El investigador Janeway pronosticó que las células inmunológicas innatas expresan receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y que además poseen una alta especificidad para reconocer estructuras moleculares conservadas (PAMPs) (24). *Drosophila* no posee un sistema de inmunidad adaptativa sin embargo es capaz de mostrar una respuesta efectiva contra la invasión de microorganismos. Las proteínas Toll presentes en la mosca *Drosophila* son las responsables del reconocimiento de bacterias y hongos y de la inducción de péptidos antimicrobianos y responden a las macromoléculas microbiales a través de las señales intracelulares mediante la activación de la cinasa Pelle que activa a otra molécula Dorsal que se transloca al núcleo donde promueve la expresión de genes. Los receptores Toll fueron descubiertos en 1980 por C. Nüsslein-Volhard y K. Anderson y están implicadas de igual forma en el establecimiento del eje dorso-ventral en la embriogénesis de *Drosophila* (25).

A finales de la década de los 90 se identificó la primera proteína en humanos que estructuralmente es muy similar al receptor Toll de *Drosophila* a esta proteína se le llamó receptor tipo Toll (TLR). En 1997 Janeway y su grupo caracterizaron otro receptor tipo Toll en mamífero (TLR4 humano) y fue el primero implicado en la función de la respuesta inmunológica, a la fecha se han caracterizado 10 proteínas transmembranales en células humanas que han mostrado pertenecer a la familia de TLR en mamíferos.

Toll y proteínas de la familia TLR se caracterizan por la presencia de dominios extracelulares con una repetición rica en leucina (LRR) y regiones citoplasmáticas llamadas TIR en base a su homología con receptor a interleucina-1. Los dominios TIR para ambos el Toll de *Drosophila* y TLR en

mamíferos, son homólogos y activan componentes intracelulares similares. Por ejemplo, la familia TLR puede activar el factor nuclear (NF)-κB a través de la fosforilación y degradación de IκB. Toll también puede llevar a cabo la activación de la familia homóloga de NF-κB, Dif, mediante la degradación del homólogo de IκB, designado Cactus. Entonces Toll y familias de TLR son un sistema filogenéticamente conservado para la defensa del huésped (figura 5).

LIGANDO

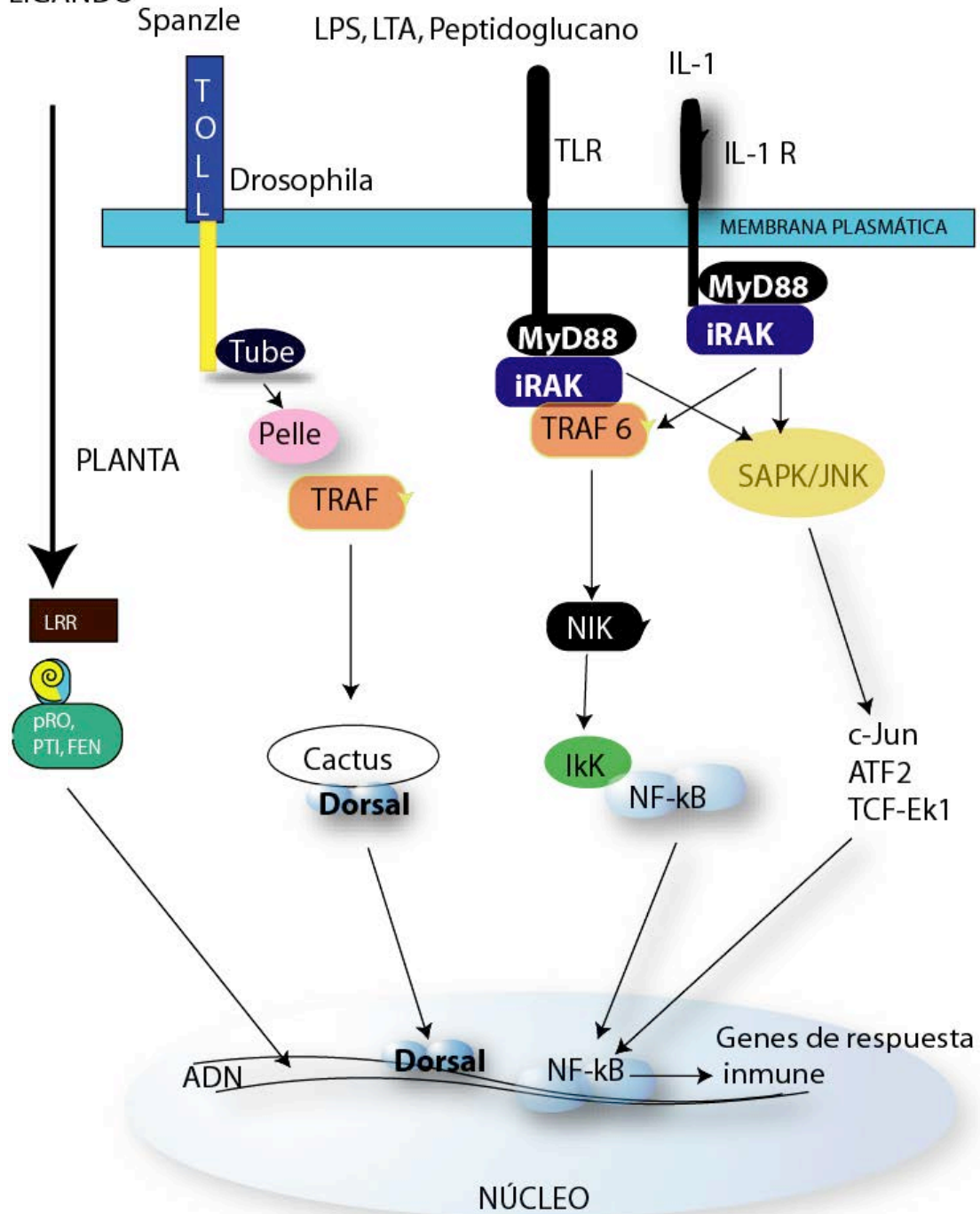


Figura 5 Representación esquemática de las rutas homólogas de los factores de resistencia de la planta/dToll/hToll/IL-1R

Abreviaturas: ATF2, factor 2 de transcripción activada; fen, pti.pto, elementos representativos de la cascada de transducción de señal de resistencia en plantas; IKK, cinasa de I- κ B; IL-1 β , interleucina-1 β ; IRAK asociada al receptor de IL-1 β ; JNK, cinasa NH2 terminal de jun; L6, M, N, Rpp5, receptores homólogos a Toll/Il-1 en plantas; LRR, repetición rica de leucina, NK- κ B, factor nuclear- κ B; NIK, cinasa inductora de NF- κ B; SAPK, proteína cinasa activada por estres; TCF/EIk1, factor complejo ternary, TRAF6, factor asociado al receptor de TNF tipo 6.

Defensa innata del periodonto.

La gran vascularización de los tejidos periodontales (encía y hueso alveolar) provee a una abundante fuente de componentes celulares. Estudios histológicos muestran que en condiciones normales se encuentra una “pared” de neutrófilos localizados entre las bacterias y el epitelio de unión además estas células como mecanismo de defensa sintetizan interleucina-8 (IL-8), E-selectina y la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1). La expresión de IL-8 es abundante en las capas superficiales de las células del epitelio de unión mientras que los niveles de ICAM-1 se incrementan en áreas expuestas a las bacterias. Estos mediadores inflamatorios son necesarios para la diapédesis de los leucocitos de los vasos sanguíneos y su migración hacia los tejidos.

Las células gingivales epiteliales son la principal fuente de secreción de IL-8 (así mismo las células endoteliales y los fibroblastos también secretan esta molécula). La expresión de E-selectina en células endoteliales facilita la etapa de migración leucocitaria. Es probable que la regulación y expresión de estos mediadores moleculares faciliten el movimiento de neutrófilos hacia el surco gingival, donde tienen gran importancia como mecanismo de protección bacteriana.

La pérdida de la función protectora de los neutrófilos ocasionada por deficiencia congénita o inducida químicamente con agentes con actividades anti-mitóticas como ciclofosfamida conduce al desarrollo de la enfermedad. Existe una relación entre defectos congénitos de la quimiotaxis de los neutrófilos, depresión del sistema inmunológico innato y el incremento de la periodontitis severa que se observa en pacientes con diabetes tipo I y II y los que fuman cigarrillos, puro o pipa.

La inflamación puede activarse tanto en condiciones de salud y de enfermedad oral pero aún se conoce muy poco como influye el cambio de composición microbial en la respuesta inflamatoria.

Endotoxinas bacterianas - Lipopolisacárido.

El suero de pacientes con periodontitis resulta positivo para anticuerpos contra varios componentes estructurales de *P. gingivalis* incluyendo la proteína de la membrana exterior, la cápsula y la fimbria y los productos bacterianos activos biológicamente contra los anticuerpos: LPS, hemaglutinina y proteasa tipo tripsina. Por otra parte LPS de *P.gingivalis* es un potente inductor de respuestas biológicas como resorción de hueso, activación policlonal de células B y proliferación de fibroblastos (26). LPS de *P.gingivalis* induce a los macrófagos y fibroblastos gingivales a producir citoquinas (27).

Fibroblastos gingivales como células inmunocompetentes.

Los fibroblastos son las células más abundantes en el tejido conectivo. La función de estas células es la producción de proteínas estructurales del tejido conectivo como elastina y colágeno. Los fibroblastos periodontales son los responsables de la síntesis y degradación del tejido conectivo, secretan citoquinas inmunoregulatorias y mediadores químicos; las citoquinas están implicadas en la homeostasis del tejido y en la patogenia de muchas enfermedades infecciosas (28). En las enfermedades infecciosas la invasión de bacterias y sus productos inducen una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunopatológicas, los factores microbiales y el sistema inmunológico del huésped están asociados en la etiología de la periodontitis.

Receptores de LPS en fibroblastos gingivales.

CD14 membranal (mCD14) y CD14 soluble (sCD14).

La molécula CD14 que fue identificada como un receptor de reconocimiento bacteriano para LPS, se localiza de dos maneras, una es el glicosilfosfatidilinositol (GPI) asociado a membrana (mCD14) y la forma soluble

de CD14 (sCD14) que carece de la estructura GPI. El LPS se une por medio de su lípido A con otra proteína denominada proteína de unión a LPS (LBP), que es una glucoproteína encontrada en el suero en condiciones normales y en fase aguda de infección se presenta en más altas concentraciones de esta forma aumenta la sensibilidad de los monocitos/macrófagos y neutrófilos ante LPS. La molécula CD14 cuando es expresada en la superficie de los monocitos/macrófagos y neutrófilos funciona como un receptor del complejo de LPS y LBP; la forma sCD14 facilita la activación de las células epiteliales inducidas por LPS las cuales no expresan mCD14. CD14 no puede mediar eventos de señalización ya que no es una proteína transmembranal pero debido a la presencia del GPI, es importante para la activación celular y la producción de citoquinas. (29). Wang y colaboradores (30) mostraron que los fibroblastos gingivales expresan CD14 .

Los fibroblastos gingivales expresan de forma heterogénea a CD14, al receptor de IL-10 y a receptores tipo Toll (TLRs) y pueden separarse en muchas poblaciones. Por otro lado sCD14 participa en la expresión de la molécula de adhesión celular -1 (ICAM-1) cuando los fibroblastos gingivales son tratados con LPS (30).

La ruta de LPS de *Porphyromonas gingivalis* vía TLR-4 (TLR4).

Cuando el LPS se asocia al receptor TLR-4 da inicio la respuesta de la célula mediante la activación de un conjunto de proteínas denominadas cinasas cuya función es transferir un grupo fosfato del ATP a diferentes proteínas en residuos de Serina, Treonina y tirosina. Los cambios en el estado de fosforilación de las proteínas son las señales intracelulares que tienen entre otros propósitos la de regular el metabolismo celular y la expresión de genes. Estos eventos de fosforilación se efectúan de forma coordinada y específica; al conjunto de proteínas que se fosforilan se denomina vías de transducción.

A la fecha se han caracterizado al menos 2 vías. La primera es la ruta dependiente de MyD88, la cual subsecuentemente activa a IRAK, TRAF6 y al factor de transcripción denominado NF- κ B; esta ruta es esencial para la producción de citoquinas. La segunda es una ruta independiente de MyD88 que no activa a IRAK, pero que conduce a la activación y translocación del

factor de transcripción NF- κ B en donde realiza la expresión génica. La sobreexpresión de TLR4 no sólo activa NF- κ B sino también al factor de transcripción AP-1 y a la cinasa terminal N-Jun (JNK).

Los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 están implicados en la regulación de muchos genes pro-inflamatorios e inmunomodulatorios. La ruta de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) también es activada en respuesta a los ligandos microbiales, la MAP3K y TAK1 parecen estar involucradas en la activación de NF- κ B inducida por LPS. TAK1 es el punto donde se bifurca la cascada MAP y la cascada IKK. AP-1 es activada por la ruta de MAPK.

Con respecto a la ruta de señalización de los TLRs en fibroblastos gingivales humanos (HGFs), se ha demostrado que TLR4 es el receptor para LPS de *P.gingivalis* e induce la producción de IL-1. Por otra parte se ha descrito que cuando los macrófagos y los fibroblastos gingivales son tratados con una alta concentración de LPS, el LPS activa ciertos receptores sin involucrar a LBP y CD14 (31).

Una opción para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Con respecto al papel de los factores etiológicos locales en la enfermedad periodontal, la placa dental y las bacterias que habitan las bolsas periodontales liberan LPS y otros productos bacterianos en el surco gingival. Estas sustancias afectan a las células inmunológicas del tejido conectivo y a los osteoblastos lo que conduce a la producción de citoquinas en células inmunológicas. CD14 y los receptores TLR desencadenan respuestas biológicas inducidas por LPS en monocitos/macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. Los componentes de las rutas de transducción de señales de LPS vía CD14 o TLRs son blancos potenciales para desarrollar terapias médicas para la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal, las opciones que podrían utilizarse en la terapia periodontal sería: evitar la unión de LPS a las células inmunocompetentes o evitar la inducción de rutas por la unión de LPS a CD14 o a TLR4 (31).

Ciertas proteínas de la saliva proveen funciones de defensa contra bacterias, hongos y virus, algunas de estas proteínas antibacterianas controlan la

estabilización de la flora y actúan contra patógenos invasores. Se han examinado efectos de las proteínas de la saliva como mucinas, IgG, lactoferrinas, peroxidasa, amilasa, lisosimas e histatina ante los estímulos por LPS de *P.gingivalis* y se ha encontrado que reducen el nivel de actividad de LPS; estas proteínas también podrían ser usadas para tratar la periodontitis (31).

Referencias.

1. Lindhe Jan. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana 2000.
2. Genco.J. Robert Peridoncia Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. Vol. 1 num México 1993.
3. Tobias PS, Gerner J, Tapping R, Orr S, Mathison J, Lee JD, Kravechenko V, Han J, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide dependent cellular activation. J. Periodontal. Res. 1997, Jan : 32 (1 Pt 2) : 99-103.
4. Kinder SA, Holt SC, Korman KS. Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. J. Clin Microbiol. 1986 Jun23(6): 1127-1133.
5. Hamada S, Takada H, Ogawa T, Fujiwara T, Mihara J. Characterization an immunobiologic activities of lipopolysaccharides from periodontal bacteria. Adv. Dent. Res. 1990; 2: 283-291.
6. Mc Coy SA, Creamer HR, Kawanami M, Adams D. The concentration of lipopolysaccharide on individual root surfaces at varying times following in vivo root planning. J. Periondontol 1987; 58: 393-399.
7. Moore J, Wilson M, Kieser J. The distribution of bacterial lipopolysaccharide in relation to periodontally involved root surfaces. J. Clin. Peridontol 1986; 13: 748-751.
8. Wilson M, Moore J, Kieser J. Identity of Limulus amoebocyte lysate-active root surface materials from periodontally involved teeth. J. Clin Periodontol 1986; 13: 743-747.
9. Moughal N A, Adonogianaki E, Thornhill M y Kinane D (1992) Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. J. Periodont Res 27: 623-630

10. Kumada H, Haishima Y, Umemoto T y Tamamoto K (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 177: 2098-2106
11. Kumada H, Kondo S, Umemoto T y Hisatsune K (1997) Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctanate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS. Microbiol Lett.* 108(1): 75-79
12. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, y Hamada S (1990) Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136: 319-326
13. John B, Olsen I y Bryn K. (1983) Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacterioides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides loescheii*. *Oral Microbiol Immunol* 3: 22-27
14. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K y Hata S (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403
15. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K y Hata S. (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403
16. Page R C y Schroeder H E (1981) Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J. Periodontol.* 52: 477-491.
17. Tonetti MS, Imboden M, Gerber L y Lang N (1994) Localized expression of mRNA for phagocyte specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infet. Immun.* 62: 4005-4014
18. Gemmell E, Walsh L y Savage N (1994) Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodontal Res.* 29: 46-53
19. Kumada H, Haishima Y, Umemoto T y Tamamoto K (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 177: 2098-2106
20. Kumada H, Kondo S, Umemoto T y Hisatsune K (1997) Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctanate region of lipopolysaccharide

- isolated from *Porphyromonas gingivalis*. FEMS. Microbiol Lett. 108(1): 75-79
21. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, y Hamada S (1990) Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J. Gen. Microbiol. 136: 319-326
 22. John B, Olsen I y Bryn K. (1983) Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacterioides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides loescheii*. Oral Microbiol Immunol 3: 22-27
 23. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K y Hata S (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. Microbiol Immunol 29(5):395-403
 24. Janeway C.A. Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Colde Spring Harb Symp Quant Biol 54:1-13.
 25. Yang R.B., Mark MR., Gray A. Huang. A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W., Gurney A.L., Godowski. P.J.(1998). Toll like receptor-2 mediates lipopolisaccharide induced cellular signaling. Nature 395:284-288.
 26. Hefti A.F. (1993). Aspects of cell biology of the normal periodontum. Periodontology (2000) 3: 64-75.
 27. Hailman E. Linchenstein H.S., Wufel MM, Miler D.S., Johnson D.A., Kelley M. et. al. (1994). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. J Exp Med 179:269-277.
 28. Wang D-L., Sato K., Oido M, Fujii T., Kowashi Y., Shinohara M, et. al.(1998). Involvement of CD14 on human gingival fibroblast in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide mediated interleukin-6 secretion. Arch Oral Biol 43:687-694
 29. Haziot A. Hijiya N., Goyert S.M. (1998). Role of CD14 in infection: studies in CD14 deficient mice. Prog Clin Biol Res 397:255-260.
 30. Wang P.L., Oido- Mori M, Fujii T., Kawashi Y., Kikuchi M, Suetsugu Y, et. al. (2001). Heterogenous expression of Toll-like receptor 4 and down regulation of TII-like receptor4 expression on human gingival fibroblast *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Biochem Biophys Res Commun 288: 863-867.

31. Wang D.L. Azuma Y, Shinohara M, Tonuka J., Okura k.(2001). Effect of salivary proteins on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activity. Dentistr Jpn 37: 39-41.

DIRECTORIO

Dra. S. Aída Borges Yáñez

Coordinación de Salud Pública Bucal
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
Email: aborges@servidor.unam.mx

Dra. Claudia González Espinosa

Departamento de Farmacobiología
Cinvestav
IPN
Email: geclaudia@yahoo.com.mx

Dr. Jesús A. Olivares Reyes

Departamento de Bioquímica
Cinvestav
IPN
Email: jolivare@cinvestav.mx

Tecilli Cabellos-Avelar y Dr. Jorge Membrillo-Hernández.

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM
Email: jmh@biomedicas.unam.mx y tecilli@correo.unam.mx

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular; UNAM.
Email: molquin@ifc.unam.mx y rhernand@ifc.unam.mx

Dr. Luis Alberto Gaitan Cepeda.

Patología Clínica y Experimental.
Departamento de Salud Pública Bucal
Facultad de Odontología
UNAM.

Email: jmh@biomedicas.unam.mx

Dra. Marina Macías-Silva

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular
UNAM

Tel: (55) 56-22-5729

Fax: (55) 56-22-5611

Email: mmacias@ifc.unam.mx

Dr. Luis García Aranda.

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM

Email: rlga@servidor.unam.mx

Dra. Erika P. Rendón-Huerta

Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM.

Emails: erendon@bq.unam.mx y galfer@servidor.unam.mx

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Laboratorio de Bioquímica
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM

Email: gloria@fo.odonto.unam.mx

COMITÉ ORGANIZADOR

Gloria Guitierrez Venegas

Silvia Maldonado Frías

Santa Rita Arroyo Cruz

Miguel Pérez Garzón

Perla Kawasaki Cárdenas

Carlos Tomás Joaquín Islas

Cinthia Rojas García

Patricia Cardoso Jiménez

Carlos Giroshi Bando Campos

Noé Jerónimo González

María del Carmen Ramírez Martínez

Programa

Universidad Nacional Autónoma de México

biología oral



9 y 10 de diciembre, 2005
auditorio alfonso caso
Facultad de Odontología



conferencistas

9 de Diciembre
Inauguración

- Dra. Aída Borges**
Profesor de Salud Pública
División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología, UNAM
Tema: Salud Bucal de los Ancianos
- Dra. Claudia González Espinosa**
Investigador Titular del CINVESTAV
Tema: Las moléculas y las células detrás de las alergias
- Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**
Investigador Titular del CINVESTAV
Tema: Hipertensión y diabetes. ¿Dos historias diferentes?
- Dr. Alejandro Zentella-Dehesa**
Investigador Titular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Tema: El Sistema NF- κ B en el proceso central de la inflamación
- Dr. Jorge Membrillo-Hernández**
Investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Tema: Biología Molecular de la Formación de Bioespas Bacterianas
- Dr. Rolando Hernández Muñoz**
Investigador Titular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Tema: Avances en el estudio de la patología gástrica inflamatoria

10 de Diciembre

- Dr. Luis Goytán Capedo**
Pro. Titular de Patología, División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM
De la Investigación clínica a la aplicación clínica de la investigación
Tema: El caso de SIDA oral
- Dra. Marlene Macías Silva**
Investigadora Titular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Tema: El factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) y la regeneración hepática
- Dra. María Eugenia Torres Marquéz**
Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM
Tema: Adaptaciones de los mecanismos de transducción en protozoarios parásitos
- Dr. Luis García Arends**
Profesor Titular de Endocrinología
División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología UNAM
Tema: Factores etiológicos de la Enfermedad pulpa periapical

informes e inscripciones
coordinación de educación
continua
facultad de odontología
teléfonos:
5623 2227 / 5623 2244
5623 2225 / 5623 2220


laboratorio de bioquímica
teléfono:
5622 5554
gloria@ls.odonto.unam.mx

Destinatario	Después del 1° de Noviembre	
Profesionistas	\$800.00	\$700.00
Profesores	\$300.00	\$350.00
y Alumnos		

Dra. Erika P. Rendón Huerta
Prof. Titular del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM
Tema: Estructura y Función de las Uniones Estrechas

Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas
Profesor de Bioquímica División de Estudios de Posgrado de Investigación Facultad de Odontología
Tema: Las endotoxinas y sus mecanismos de acción en el desarrollo de la enfermedad periodontal







Logos of sponsors: borgatto, COA Internacional, DENTSPLY Mexico, Neostar Vivadent, Vantall, ULTRADENT, 3M ESPE, dentadec, OralB, Tricent, SI.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología

biología oral



auditorio **alfonso caso**



informes e inscripciones:

coordinación de educación continua

facultad de odontología
edificio principal

laboratorio de bioquímica DEPI
facultad de odontología

teléfonos
5623 2227 / 5623 2244
5623 2225 / 5623 2220
5623 2208

ed_continua_odonto@correo.unam.mx
gloria@fo.odonto.unam.mx

9 y 10 de diciembre, 2005

Background text: congreso segundo

programa académico

Objetivo:

Tiene el propósito de divulgar investigaciones que en Biología Oral se realizan en la Facultad de Odontología

Dirigido a:

Alumnos, Profesores,
Especialistas y Cirujanos Dentistas.

9 de diciembre

Registro		8:30-9:00
Mtro. Javier de la Fuente	Inauguración	9:15-9:30
Dra. Aída Borges	Salud Bucal de los Ancianos	9:30-10:10
Dra. Claudia González Espinosa	Las moléculas y las células detrás de las alergias	10:20-11:00
Dt. Jesús Alberto Olivares Reyes	Hipertensión y diabetes ¿Dos historias diferentes?	11:10-15:50
Dt. Alejandro Zentella	El Sistema NF-κB en el proceso central de la inflamación	12:00-12:40
Dt. Jorge Membrillo-Hernández	Biología Molecular de la Formación de Biocapas Bacterianas	12:50-13:40
Dt. Rolando Hernández Muñoz	Avances en el estudio de la patología gástrica inflamatoria	13:50-14:30

10 de diciembre

Dr. Luis Gaytán	De la investigación clínica a la aplicación clínica de la investigación El caso de SIDA oral	9:00-9:40
Dra. Marina Macías	El factor de crecimiento y la transformante beta (TGF beta) regeneración hepática	9:50-10:30
Dra. María Eugenia Torres Marquéz	Adaptaciones en la transducción de señales en los parásitos	10:40-11:20
Dr. Luis García Aranda	Factores Etiológicos de la Enfermedad Pulpo-Periapical	11:30-12:10
Dra. Erika P. Rendón Huerta.	Estructura y función de las uniones estrechas	12:20-13:00
Dra Gloria Gutiérrez Venegas	La endotoxinas y su papel en la Enfermedad Periodontal	13:10-13:50
Clausura y Entrega de Constancias		13:50-14:30

Donativo

Profesionistas

\$600.00

Profesores
y Alumnos UNAM

\$300.00

Incluye Beca 50%

Después del 1° de Noviembre

\$700.00

\$ 350.00

Incluye Beca 50%