



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MECANISMOS DE COMUNICACIÓN BACTERIANA EN EL
BIOFILM BUCAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ESBEIDI JASSIEL FLORES VILLANUEVA

TUTOR: Mtro. CÉSAR AUGUSTO ESQUIVEL CHIRINO

ASESORA: Esp. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A Dios por darme el existir.

A mis padres que con su amor y cariño guiaron mis pasos y me brindaron su apoyo incondicional, me enseñaron que las pruebas pueden ser más duras de lo que esperamos, pero siempre son necesarias para acercarnos más a nuestros sueños.

A mis hermanos, Cristian y Nallely, amigos y compañeros que me han brindado su compañía y apoyo en todos los momentos de mi vida, por que juntos hemos caminado y descubierto las sorpresas y maravillas que nos ha brindado la vida.

A ti Alejandro porque eres parte de mi existencia, porque me has enseñado a nunca dejar de soñar y me has compartido de tu alegría.

A mi familia porque son la base de mis logros, siempre han creído en mí, me han brindado consejos sabios y su ayuda incondicional.

Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha brindado los medios necesarios para poder realizar este sueño, esta casa que me ha moldeado y formado en sus conocimientos y cultura, me ha llenado de orgullo el pertenecer a ella.

A mis profesores de la Facultad de Odontología quienes sembraron en mí la inquietud y el deseo de seguir mi camino profesional, por compartir sus conocimientos y experiencias, con la finalidad de otorgarnos las armas necesarias para enfrentar los desafíos que nos ponga la vida.

A la Dra. Luz del Carmen y al Mtro. César Augusto por brindarme su apoyo y dedicación en la elaboración de este trabajo.

Gracias.

“Cuando una persona realmente desea algo, el universo entero conspira para que realice sus sueños.”

Paulo Coelho.

ÍNDICE

Introducción	4
1. Definición del Biofilm	6
1.1 Estructura Bacteriana	7
1.1.1 Endospora	33
1.1.2 Glucocálix	35
1.2 Microbiota Bucal	37
2. Factores ambientales que afectan el Biofilm	41
2.1 Factores Nutricionales	41
2.2 pH	42
2.3 Necesidades de oxígeno	43
2.4 Temperatura	45
3. Biopelículas Bacterianas	48
3.1 Formación de Biofilm	50
3.1.1 Formación de Biofilm a partir de una célula planctónica	52
3.2 Unión a la superficie	54
3.3 Formación de microcolonias	59
3.4 Crecimiento del Biofilm	60
3.5 Maduración del Biofilm	62
3.6 Disgregación del Biofilm maduro	62
3.7 Formación de Biopelícula Dental	64

4. Comunicación Bacteriana	71
4.1 Señales en el Biofilm: <i>Quorum sensing</i>	75
5. Propiedades del Biofilm	84
5.1 Heterogeneidad fisiológica	84
5.2 Fenotipos	85
5.3 Capacidad Adaptativa	85
6. Ventajas del Biofilm	87
6.1 Resistencia frente a antimicrobianos	87
7. Importancia del Biofilm en la salud	90
7.1 En la cavidad Bucal	90
7.2 Control del Biofilm	96
Conclusiones	99
Referencias Bibliográficas	101



INTRODUCCIÓN

El origen de los microorganismos, de modo específico las bacterias, data de aproximadamente cuatro billones de años de antigüedad, lo que las acredita como la forma de vida más ancestral. A pesar de ello estos seres fueron observados hasta el siglo XVII, por Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), quien fue el primero en vislumbrar e indagar este interesante mundo microbiano.

El surgimiento de la microscopía electrónica y el subsiguiente perfeccionamiento de los estudios ultra-estructurales, estableció que las bacterias presentan una estructura celular procariótica –rudimentaria primitiva– conforme a su análisis.

Las bacterias, microorganismos unicelulares, poseen estructuras que son comunes a todas ellas, independientemente de la forma que tengan. Dichas estructuras favorecen su adaptación al medio ambiente y su posible capacidad para causar enfermedades.

En la naturaleza la mayoría de los microorganismos viven en grupos que se adhieren a una superficie formando biofilms. Los biofilms representan una comunidad de células sésiles que crecen unidas irreversiblemente a una superficie sólida, viva o inerte; embebida en una matriz extracelular producida por ellas mismas, exhibiendo un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y transcripción de genes.

Actualmente los biofilms son considerados factores de virulencia, puesto que constituyen un modo de crecimiento protegido, lo cual permite la



supervivencia en un medio hostil, facilitando la unión de las bacterias a distintas superficies, ayudando al mantenimiento de las colonias y protegiéndolas de distintos factores, como los cambios en las condiciones ambientales, la posibilidad de ser fagocitadas por macrófagos, ser agredidas por otros protozoos o por el efecto de los agentes antimicrobianos.

Las bacterias han sido consideradas como organismos no diferenciados y no cooperativos, descartándose cualquier posibilidad de que existiesen mecanismos de comunicación intercelular en organismos unicelulares. Sin embargo en la actualidad se sabe que las bacterias han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten descubrir y responder a las condiciones ambientales, como cambios de temperatura, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y pH. El estudio de los mecanismos de detección de estos cambios, llamados mecanismos de transducción de señales, constituye uno de los campos más activos de la microbiología.

El *Quorum Sensing* es un mecanismo de señalización por el cual las bacterias regulan sistemas complejos de comportamiento. Este hecho hace que las bacterias se asocien en comunidades en las que coordinan la expresión de determinados fenotipos que les confieren mayor resistencia y adaptabilidad al medio ambiente, como la expresión de factores de virulencia, y la maduración del *biofilm*, los cuales tienen un papel importante, entre otros, en el desarrollo de procesos infecciosos.

En la actualidad muchas investigaciones se centran en la búsqueda de compuestos que puedan inhibir el *Quorum Sensing* como blanco antipatogénico y no antibacteriano evitando uno de los problemas más preocupantes en la actualidad: el desarrollo de resistencia a los fármacos.



1. DEFINICIÓN DEL BIOFILM

El biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Costerton definió al biofilm como una comunidad bacteriana bien organizada rodeada por una capa externa llamada glucocáliz, de un aspecto gelatinoso, compuesta principalmente por polisacáridos. Dicha capa le brinda a la bacteria facilidad para adherirse a distintas superficies, desempeña también una función muy importante en la nutrición bacteriana, en la defensa de la célula a distintos agentes físicos y químicos, en la respuesta inmune y mecanismos de patogenicidad.¹

El biofilm es una comunidad microbiana caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas y presentan un fenotipo alterado con respecto al grado de multiplicación celular ó a la expresión de sus genes.² (Fig. 1)

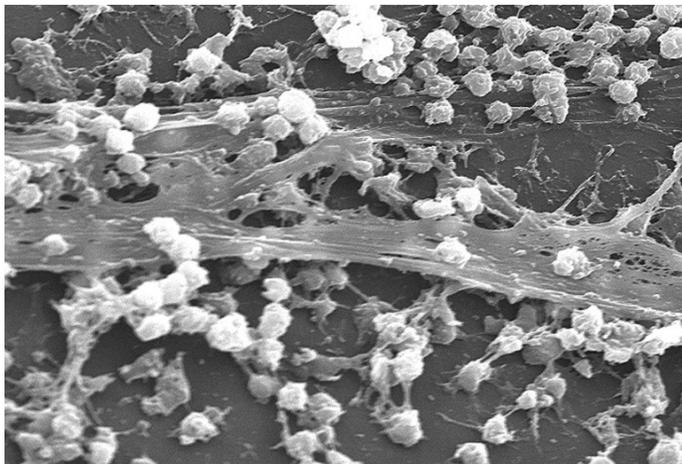


Fig. 1 Fotografía de microscopía de barrido de un Biofilm de *Staphylococcus aureus*.³



1.1 ESTRUCTURA BACTERIANA

Las bacterias son microorganismos que pertenecen al reino procariota de modo que presentan una estructura celular simple y sin membrana nuclear.

El papel biológico de las bacterias se comprende a partir del conocimiento de la estructura y ultraestructura celular.

Estructuralmente la célula bacteriana está constituida por:

- Cubierta celular compuesta por pared celular y membrana citoplasmática.
- Estructuras internas de la cubierta celular: citoplasma, material genético y endoespora.
- Estructuras externas de la cubierta celular: glucocálix, flagelo, pili (fimbria) y estructuras fibrilares. (Fig. 2)

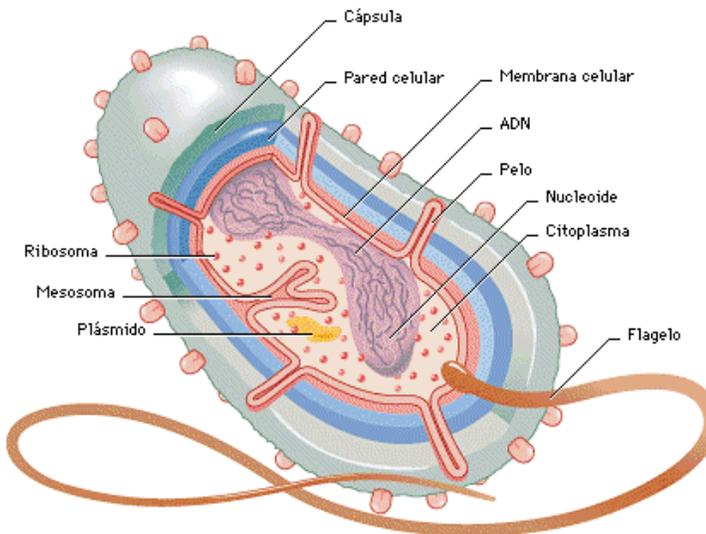


Fig. 2 Esquema de una bacteria⁴



ESTRUCTURAS QUE FORMAN LA CUBIERTA CELULAR.

PARED CELULAR

En la mayoría de las bacterias la pared es la estructura más externa y es bastante rígida, representa entre el 10 y 50 % del peso celular seco.

Está compuesta por polisacáridos, proteínas y lípidos. En estado natural las bacterias patógenas para el hombre son incoloras. Según la reactividad que presentan las bacterias a la tinción de Gram, se clasifican en: bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas.

La distinta forma en que se comportan las bacterias frente a las soluciones colorantes se debe a que cada grupo posee una composición química diferente, aunque algunos autores opinan que esto depende de la conformación física de esa estructura más que de la composición química.⁵ (Fig. 3)

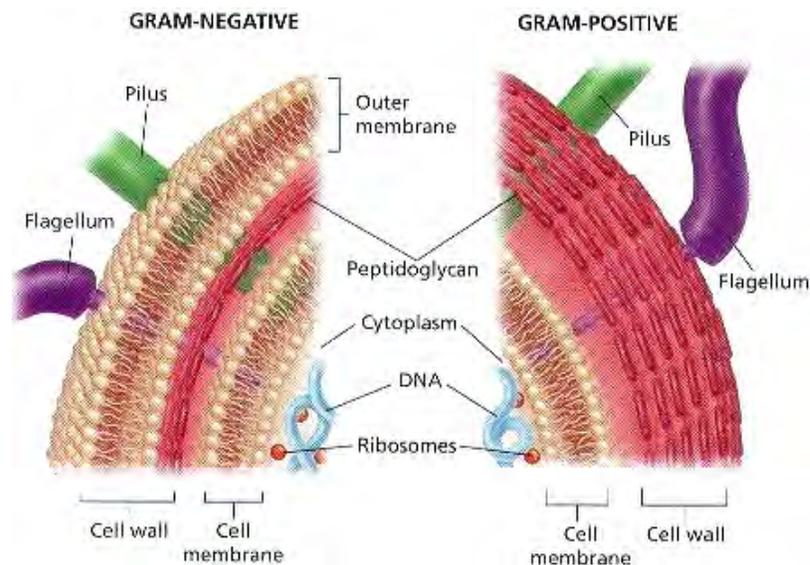


Fig. 3 Envolturas bacterianas gramnegativa y grampositiva.⁶



La pared celular interviene en la determinación de la morfología celular, protege a la célula de la lisis osmótica y de sustancias tóxicas, además de contribuir a su patogenicidad.⁷

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMPOSITIVAS.

Su estructura básica está constituida por un polímero denominado mureína o peptidoglucano.

En las bacterias, la unidad estructural del peptidoglucano está formada por dos amino-azúcares: el ácido N.acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina (NAG) y diversos aminoácidos de la serie D y L. El NAM y la NAG se unen mediante enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ y los aminoácidos lo hacen, en cadena, al grupo láctil C3 del NAM. (Fig. 4)

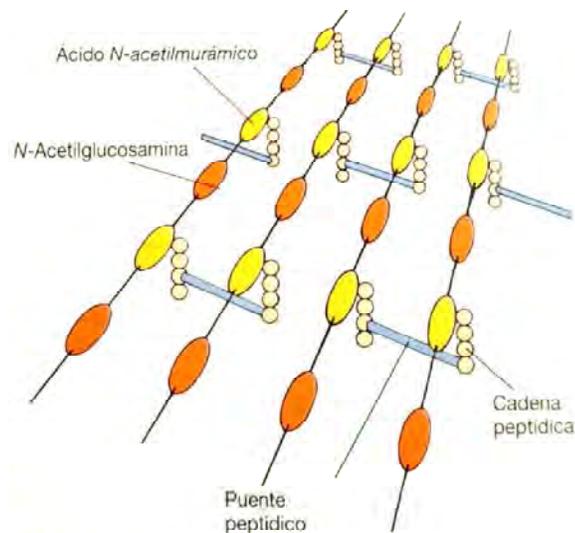


Fig. 4 Estructura del peptidoglucano. Diagrama esquemático de un modelo de peptidoglucano. Se muestra las cadenas de polisacárido, las cadenas laterales de tetrapéptido y los puentes peptídicos.⁷



Esta unidad estructural se repite de 20 a 80 veces en la estructura de la mureína, lo que constituye una fibra del peptidoglicano. Las distintas fibras están enlazadas por enlaces interpeptídicos.⁸

En estas bacterias la pared celular es una estructura muy gruesa y está constituida por ácidos teicoicos (uniones de alcohol y fosfato), teicurónicos y lipoteicoicos. Estos ácidos le confieren a esta capa una carga eléctrica negativa, lo que facilita la unión del microorganismo al diente o a la mucosa, además de permitir la unión o la agregación interbacteriana, por lo que son factores de virulencia.^{5, 8}

Los compuestos adicionales de la pared son otros polisacáridos y proteínas que también pueden sobrepasar la mureína, parecen formar una capa hacia la zona más externa de la pared, constituyendo la capa o estrato S.⁸ (Fig. 5)

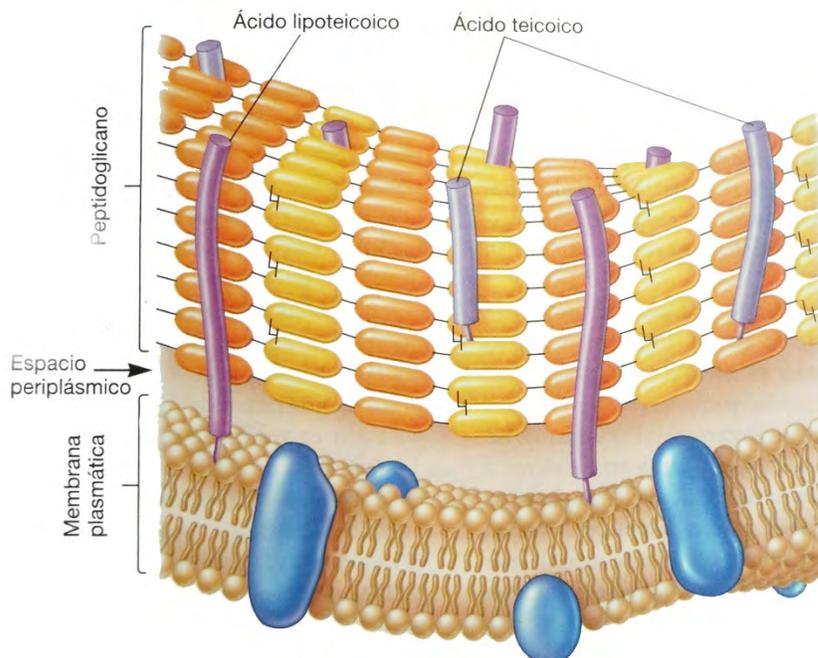


Fig.5 Envoltura grampositiva.⁷



PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.

Constituida desde fuera hacia adentro, por la membrana externa y el periplasma (espacio periplásmico). Incluido en el periplasma se halla el peptidoglucano.

La estructura y composición del peptidoglucano es similar al de las bacterias grampositivas; sin embargo, el número de fibras y de capas es menor, por lo cual su grosor es inferior.^{5, 8} (Fig. 6)

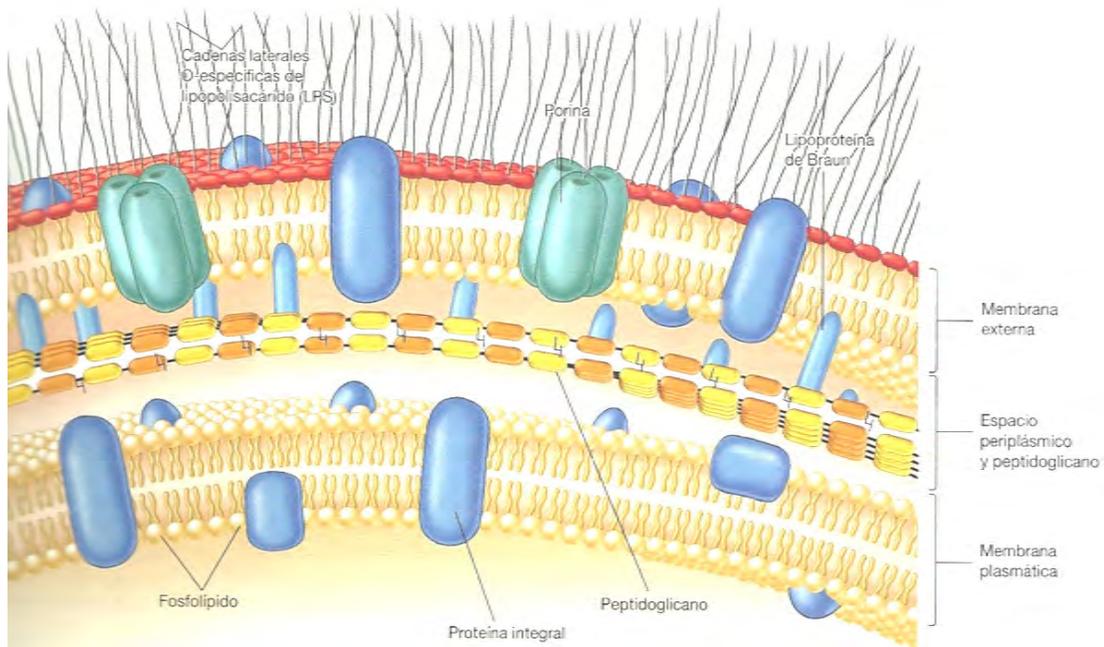


Fig. 6 Envoltura gramnegativa.⁷

El espacio periplásmico está delimitado por la cara interna de la membrana externa de la membrana citoplasmática, ambas son hidrófilas. En su interior alberga el peptidoglucano que corresponde del 5 al 10% de esta pared.



En el periplasma se encuentran concentradas también enzimas hidrolíticas, denominadas genéricamente hidrolasas y proteínas de unión, que participan en el transporte y metabolismo de nutrientes de dicha célula.⁹

Envolviendo el cuerpo bacteriano, la membrana externa, al igual que el peptidoglucano confiere integridad a la célula bacteriana.

El componente lipoproteico se encuentra embebido en la membrana externa y covalentemente unido al péptidoglucano: su principal función es estabilizar la membrana externa.

La membrana externa es la parte más superficial de la pared celular de las bacterias gramnegativas y está constituida por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas. Está formada por dos capas u hojas (externa e interna) con proteínas asociadas. (Fig. 7)

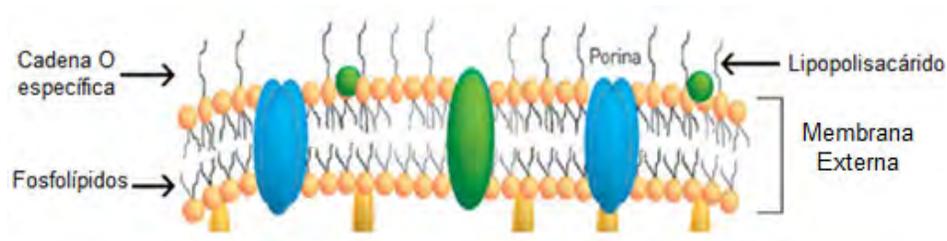


Fig. 7 Membrana externa de las bacterias gramnegativas.¹⁰

- Capa externa. Está constituida en su mayoría por lipopolisacárido (LPS). En su estructura se distinguen tres zonas:
 - La zona más superficial constituida por largas cadenas polisacáridas, denominada antígeno O, la cual es hidrófila.
 - La zona intermedia llamada núcleo o core. Está constituida por heptosas, 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) y otros azúcares.



- La porción más profunda se denomina Lípido A, está formado por un disacárido de N-acetilglucosamina esterificado por diversos ácidos grasos. Se considera que es el responsable de la actividad biológica asociada al LPS y, por tanto, a la endotoxina.⁸ (Fig. 8)

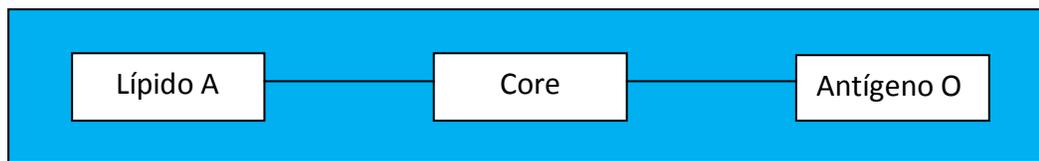


Fig. 8 Estructura del lipopolisacárido¹¹

- Capa interna. Está formada por una monocapa fosfolipídica que está en contacto con el periplasma.
- Proteínas asociadas. Se pueden clasificar en integrales o intrínsecas y periféricas, superficiales o extrínsecas, las hay estructurales y funcionales. La OmpA (outer membrane protein A) es la proteína mayoritaria en algunas bacterias gramnegativas, es estructural y mediante enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, anclan el peptidoglucano a la membrana externa.^{5, 8}

La lipoproteína de Braun desempeña funciones similares a la OmpA.

Las porinas son proteínas funcionales que intervienen en la difusión general de iones como Na⁺ y K⁺, difusión específica de aminoácidos, azúcares, nucleósidos, etc. Las porinas se agrupan formando un trímero en la membrana externa. (Fig. 9)

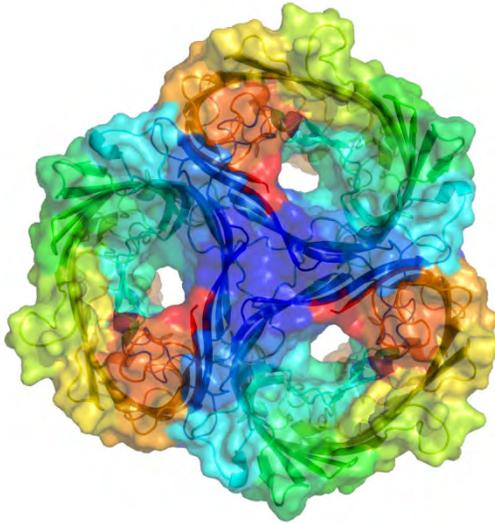


Fig. 9 En la imagen se muestra el trímero de una porina específica de *Salmonella typhimurium*, bacteria gramnegativa.¹²

Cada proteína porina atraviesa la membrana externa y es más o menos tubular; su estrecho canal permite el paso de moléculas pequeñas. Las moléculas grandes no pasan por las porinas son transportadas a través de la membrana externa por transportadores específicos. Estos transportadores específicos son proteínas que actúan como elementos en mecanismos de adhesión (receptores o adhesinas), además son reconocidos por bacteriófagos o bacteriocinas y se comportan como compuestos tóxicos y enzimáticos que estando unidos a la membrana externa se excretan posteriormente al exterior.^{7,8} (Fig. 10)

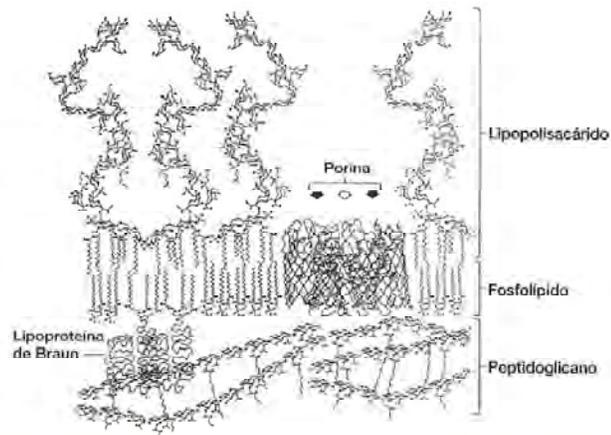


Fig. 10 Modelo químico de la membrana externa de *E. coli* y estructuras asociadas. La porina OmpF tiene dos canales en la parte delantera (flechas negras) y un canal en la parte trasera (flecha blanca) del complejo proteico trimerico.⁷

LIPOPOLISACÁRIDOS

Los lipopolisacáridos (LPS) constituyen el antígeno O y la endotoxina de las bacterias gram-negativas. Están localizados en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana y representan un factor importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedero y su sistema de defensa.⁷

Los LPS o denominados también endotoxinas bacterianas participan como mediadores de procesos inflamatorios, estas macromoléculas actúan en las diferentes células que componen la encía en donde inician una serie de procesos que deterioran las estructuras orales.



COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS ORALES.

Estas moléculas contienen lípidos y carbohidratos, están formados por cuatro dominios:

- Lípido A, es la región tóxica de la molécula
- El núcleo interno de oligosacáridos
- El núcleo externo
- La región polisacárida O – antigénica (Fig. 11)

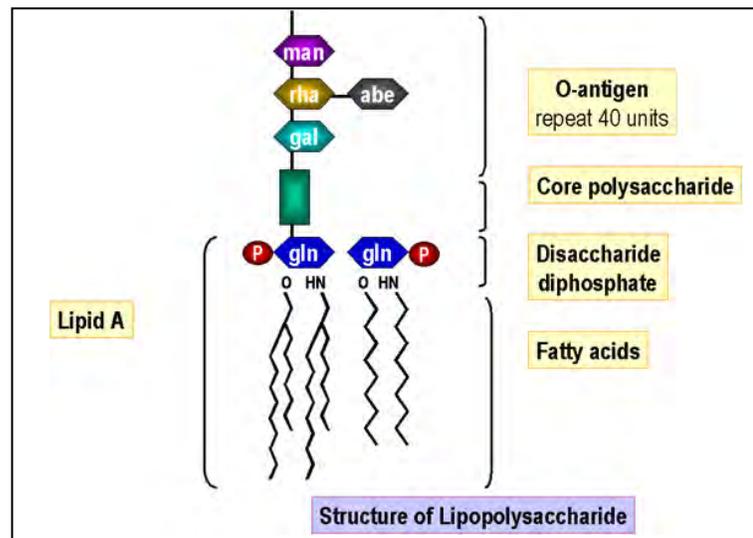


Fig. 11 Estructura de un lipopolisacárido. El ensamblaje del lípido A se lleva a cabo en la membrana celular y los azúcares centrales se le van uniendo secuencialmente. Las subunidades del antígeno-O son sintetizadas independientemente. El antígeno-O completamente sintetizado se une entonces a la región central y el lípido A, generándose el lipopolisacárido en la membrana celular, antes de su paso/inserción a la membrana externa.¹³

Las formas moleculares de los LPS predominantes en las especies periodontopatógenas presentan un lípido A que consiste en una molécula β -



(1, 6) – D – glucosamina (1, 4') disacárido fosfato, una de ácido dodecanoico 3'- hidroxilado unido en posiciones 2'y 3' a moléculas de ácido graso hidroxilado. El lípido A está unido a un núcleo interno que contiene L – glicero – D – manosa – 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.¹⁴

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, que consiste en β – (1, 6) – glucosamina disacárido fosfato sustituida con ácidos grasos hidroxilados. La estructura del lípido A más ampliamente caracterizada corresponde a *P. gingivales* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos presentan una estructura de lípido A similar a la que forma parte del LPS de *E. coli* y difieren únicamente en la sustitución de dodecanato por una molécula tetradecanato. El lípido A de los LPS de *P. gingivalis*, presenta un menor número de cadenas de ácidos grasos y es de mayor longitud en comparación al lípido A de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que se encuentra fosforilado en el átomo de carbono 1 del azúcar.¹⁴

Los LPS aislados de organismos gramnegativos, 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.



FUNCIONES DEL LOS LIPOPOLISACÁRIDOS

Puesto que el polisacárido core normalmente contiene azúcares cargados y fosfato, el LPS contribuye a la carga negativa de la superficie bacteriana. Como constituyente principal de la capa exterior de la membrana externa, el lípido A ayuda a estabilizar la estructura de la membrana externa. El LPS puede contribuir a la adhesión bacteriana a superficies y a la formación de biofilms. Además puede formar una barrera de permeabilidad, debido a su geometría y la interacción entre moléculas de LPS aledañas restringiría la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían dañar a la bacteria. También presenta funciones en la protección de la bacteria frente a las defensas del huésped, la cadena lateral O se denomina también antígeno O porque estimula una respuesta inmunitaria. Esta respuesta implica la producción de anticuerpos que se unen a la forma cepa – específica del LPS que desencadenó la respuesta inmunitaria. Sin embargo, muchas bacterias gramnegativas son capaces de cambiar rápidamente la naturaleza antigénica de sus cadenas laterales O, desorganizando de esta forma las defensas del huésped. El lípido A es tóxico en consecuencia, el LPS actúa como endotoxina. Por lo anterior si una bacteria entra al torrente sanguíneo, la endotoxina LPS podría causar un choque séptico.^{7, 14}

EFEECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LAS CÉLULAS DEL PERIODONTO.

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. Por su parte



las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los LPS en el periodonto, liberan IL-4. (Fig. 12)

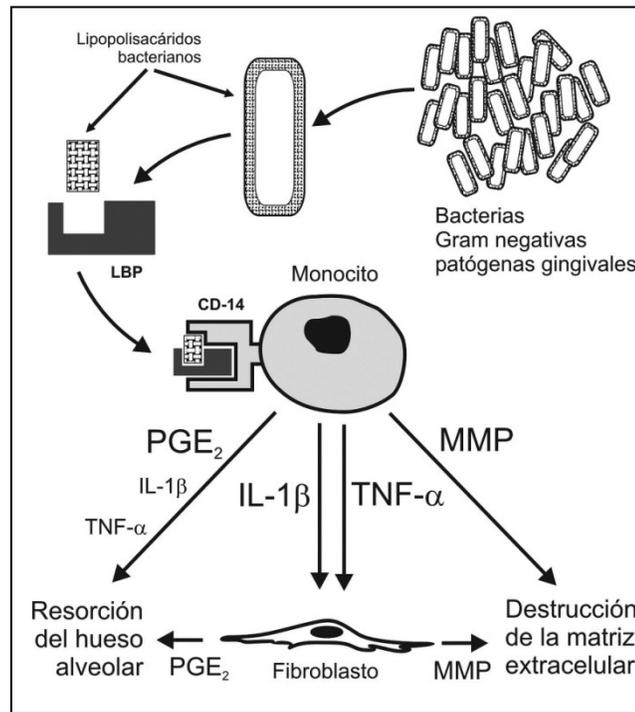


Fig. 12 Activación de los Monocitos y Macrófagos mediante la formación del complejo entre la LBP (Lipopolisacárido binding protein) y los lipopolisacáridos bacterianos y su posterior asociación con el receptor CD-14 del monocito. Nótese como la activación de esta célula resulta en la liberación de PGE₂, IL-1 y TNF que estimulan a fibroblastos residentes en el periodonto para producir más PGE₂ y metaloproteinasas que finalmente ocasionan resorción del hueso alveolar y destrucción de la matriz extracelular.¹⁵

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan tanto IL-8 como la proteína quimiotáctica monocítica (MCP - 1).

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 linfocitos y osteoclastos.



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 las cuales se encuentran en altas concentraciones en los tejidos periodontales, particularmente en el fluido crevicular, con lo que se inicia la destrucción ósea y de tejidos de soporte como el ligamento periodontal.¹⁴

MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

Se le conoce también como membrana plasmática, se sitúa por debajo de la pared celular, delimitada hacia afuera por el periplasma en las bacterias gramnegativas y por un espacio, casi inexistente en las grampositivas.

Está constituida por una bicapa lipídica y por proteínas.

- Lípidos. En su mayoría son fosfolípidos, algunas bacterias contienen también glucolípidos, en las bacterias grampositivas ciertos glucolípidos anclan los ácidos lipoteicoicos a la membrana citoplasmática. La membrana bacteriana a diferencia de los eucariontes no contiene esteroides en cantidades significativas en sus membranas.¹⁶
- Proteínas. Se distinguen dos formas:
 - Integrales o intrínsecas. Se incluyen en la bicapa, unas confieren estabilidad al conjunto y otras intervienen en el transporte de sustancias (permeasas) o forman parte de la cadena transportadora de electrones.



- Periféricas, superficiales o extrínsecas. Se encuentran unidas débilmente a superficies tanto internas como externas, se relacionan con funciones metabólicas.^{5, 8} (Fig. 13)

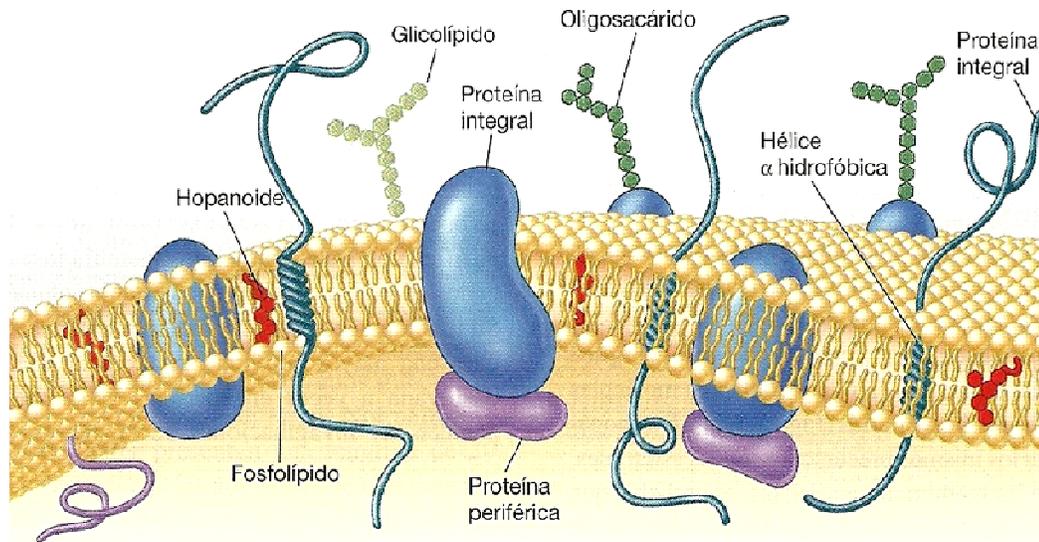


Fig. 13 Estructura de la membrana plasmática bacteriana. Este diagrama muestra las proteínas integrales (azul) flotando en la bicapa lipídica. Las proteínas periféricas (morado) están débilmente asociadas a la superficie de la membrana interna. Las esferas pequeñas representan los extremos hidrofílicos de los fosfolípidos de membrana y las colas onduladas, las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas.⁷

PROPIEDADES Y FUNCIONES.

La membrana citoplasmática funciona como una barrera de permeabilidad selectiva: permite el paso de determinados iones y moléculas, ya sea al interior o exterior de la célula, a la vez que evita el paso de otros.

Por lo anterior la membrana evita la pérdida de componentes esenciales, y cuando sea necesario facilita el movimiento de otras moléculas, cuando éstas no pueden cruzar la membrana.^{7, 8}



Los sistemas de transporte se emplean en funciones:

- Bioenergéticas, relacionadas con el transporte de electrones y fenómenos de fosforilización oxidativa que conduce a la formación de ATP a partir de ADP.
- Biosintéticas, posee sistemas que intervienen en la fotosíntesis, síntesis de lípidos y componentes de la pared celular.
- Biodegradativos, en ella radican exoenzimas que al ser excretadas degradan compuestos en otros más simples y asimilables.

La membrana citoplasmática es el sitio de acción de numerosos antimicrobianos, los cuales provocan su desorganización.

Es el lugar donde se anclan las fimbrias, pilis y los flagelos. A partir de la membrana citoplasmática surgen unas invaginaciones llamadas mesosomas, que se extienden al interior del citoplasma, parecen estar implicados en la síntesis de pared celular, replicación del ADN y en la formación del tabique que origina dos células en la división celular.¹⁷

ESTRUCTURAS INTERNAS DE LA CUBIERTA CELULAR.

CITOPLASMA

El citoplasma es un hidrogel que contiene alrededor de un 85% de agua y un conjunto de macromoléculas y estructuras, como: inclusiones de reserva, compuestos solubles, ribosomas y el nucleoide. (Fig. 14)

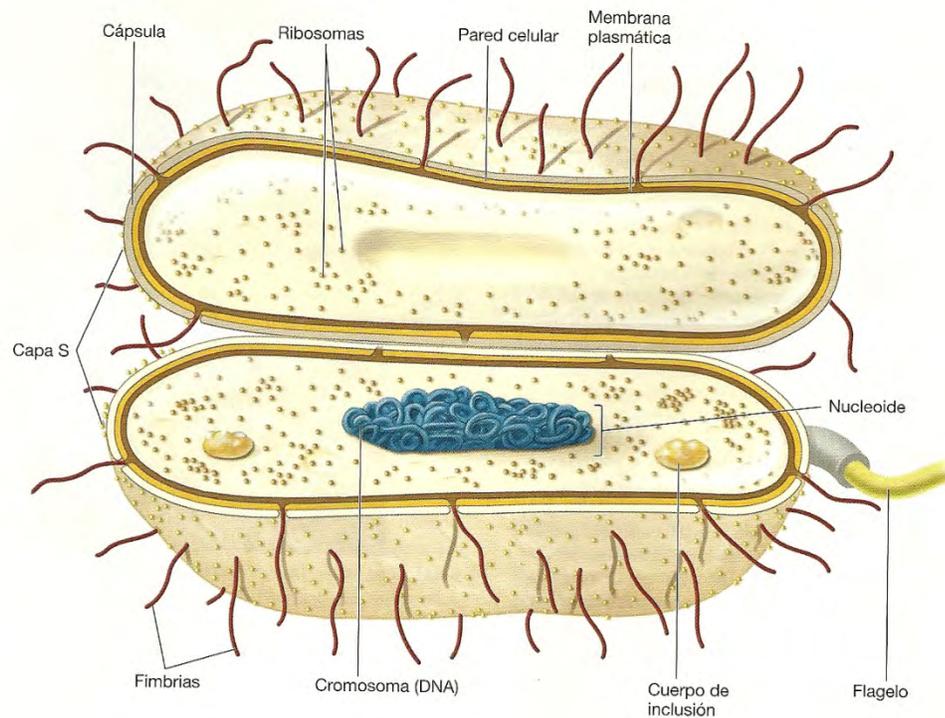


Fig. 14 Morfología de la célula procariota. En esta imagen se observan las estructuras contenidas en el citoplasma bacteriano.⁷

- Inclusiones de reserva que almacenan nutrientes y son de dos tipos orgánicas e inorgánicas:
 - Orgánicas, como las de glucógeno, almidón (reservas de carbohidratos) y ácido poli- β -hidroxibutírico (reservas de lípidos).
 - Inorgánicas, como las de polifosfatos, polímeros lineales de ortofosfatos, que son reserva de fósforo.^{5, 8}
- Compuestos solubles, como enzimas, coenzimas, aminoácidos, azúcares, sales, minerales y vitaminas.



- Ribosomas, la zona donde se ubican los ribosomas es de aspecto granular y es conocido como citosol.

Los ribosomas son elementos esféricos o ligeramente aplanados, presentes en una cantidad de 15000 por célula, es lo que confiere al citoplasma el aspecto granuloso.

Los ribosomas están formados por un 30 – 40% de proteínas y el resto por ARNr, que constituye en torno al 80% del total del ARN bacteriano.

Los ribosomas en la célula bacteriana están constituidos por dos subunidades, una menor 30s y una mayor 50s (S – unidad de sedimentación o Svedberg); durante la síntesis proteica estas dos unidades se unen, de lo cual se origina un ribosoma funcional 70s, en estas estructuras es donde se realiza la síntesis proteica y tiene lugar la acción de diferentes antibacterianos.^{7,8} (Fig. 15)

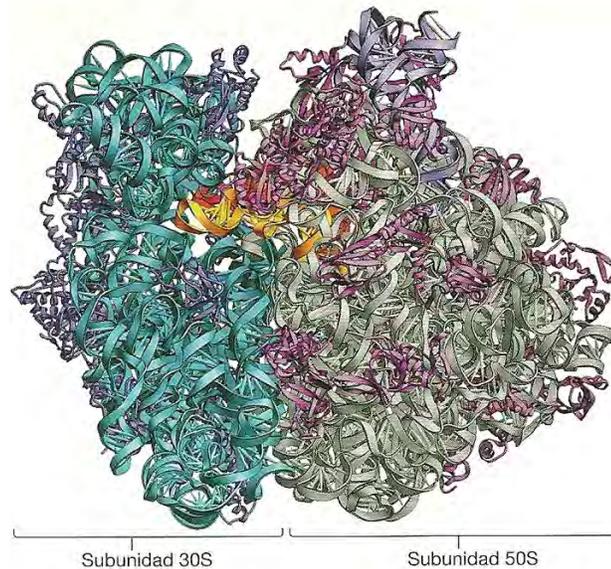


Fig. 15 Ribosoma procariota. Se muestran las dos subunidades del ribosoma bacteriano.⁷



MATERIAL GENÉTICO

A diferencia de las células eucariotas, las procariontes carecen de un núcleo delimitado por membrana. El cromosoma procarionte se localiza en una región de forma irregular denominada nucleóide.

El material nuclear o nucleóide está compuesto básicamente por ácido desoxirribonucleico (ADN), posee también algún RNA y proteínas asociadas a él ocupa aproximadamente el 20% del volumen de la célula; el DNA constituye un cromosoma único, circular que concentra toda la información genética de la célula. Su estructura fue descrita por Watson y Crick,¹⁸ quienes afirman que esa macromolécula constituye una doble hélice, donde se identifican las bases nitrogenadas complementarias entre sí: Púricas (adenina y guanina) y pirimídicas (timina y citosina), el azúcar desoxirribosa y residuos de fosfato. (Fig. 16)

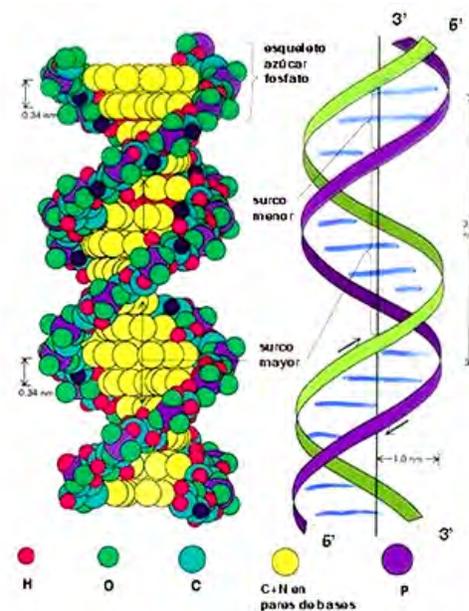


Fig. 16 Estructura del DNA bacteriano.¹⁹



El DNA bacteriano está compuesto por unidades repetitivas de nucleótidos, éstos se encuentran unidos en pares a lo largo de cadenas enrolladas en forma de doble hélice y unidos a proteínas. El ADN bacteriano contiene entre 1 y 4 millones de pares de bases. Las funciones esenciales del material genético son:

- Replicación de la información genética
- Expresión de la información genética para establecer el fenotipo del microorganismo.⁵

El DNA que conforma el genoma bacteriano puede encontrarse también en elementos extracromosómicos, como los plásmidos, transposones e integrones. Los plásmidos pueden realizar funciones como: codificar determinantes ecológicos, determinar la síntesis de factores de patogenicidad, son responsables de la resistencia antimicrobiana y dirigen la síntesis de proteínas que resultan en pilis sexuales.^{5, 8} (Fig. 17)

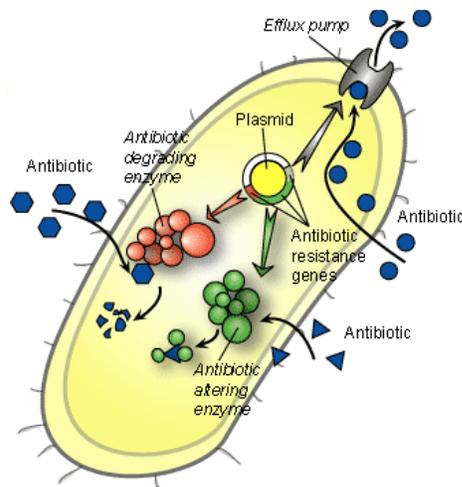


Fig. 17 Distintos mecanismos de resistencia a los antibióticos: Degradación, alteración y expulsión, generadas por un plásmido.²⁰



ESTRUCTURAS EXTERNAS DE LA CUBIERTA CELULAR

FLAGELO

La mayoría de las células procariotas móviles se desplazan utilizando flagelos. Los flagelos son apéndices motores en forma de hilo que se extienden por fuera de la membrana plasmática y la pared celular. Están constituidos por una proteína globular llamada flagelina.²¹

Los flagelos bacterianos son estructuras tubulares huecas, finas, largas, delgadas, flexibles y onduladas de aproximadamente 20nm de ancho y hasta 15 ó 20 μm de largo. (Fig. 18)

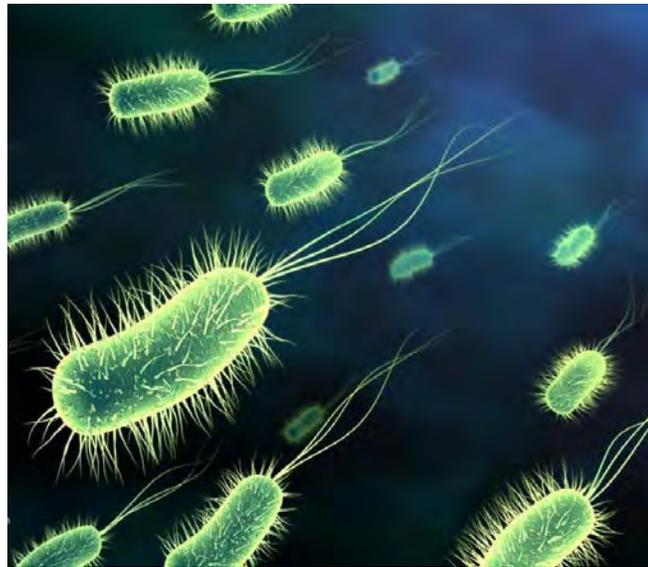


Fig. 18 Estructuras externas bacterianas.²²

Las especies bacterianas a menudo difieren en la distribución de sus flagelos, estos patrones son útiles para la identificación de bacterias.

A. Bacterias monótricas: poseen un solo flagelo.



- B. Bacterias lofótricas: presentan un penacho de flagelos en un extremo.
- C. Bacterias anfítricas: presentan uno o varios flagelos en ambos polos.
- D. Bacterias perítricas: presentan flagelos sobre toda la superficie.
- Bacterias átricas: esta clase de bacterias carecen de flagelos.(Fig. 19)

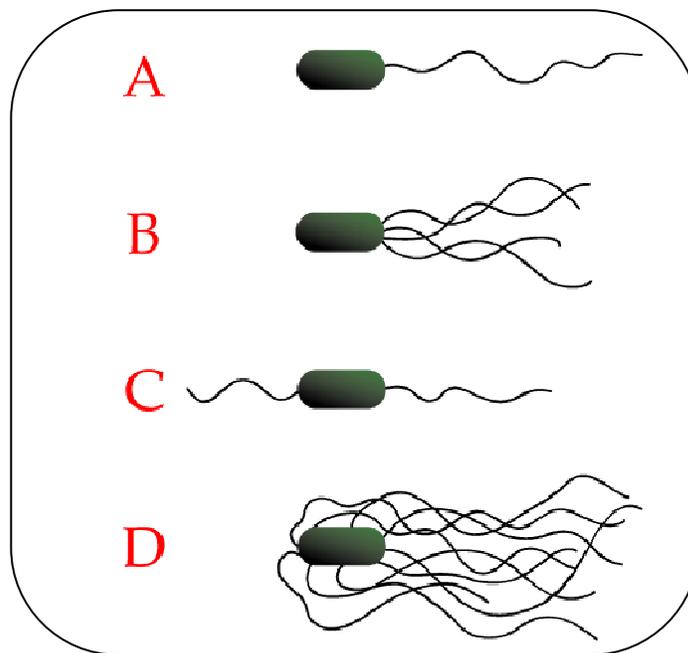


Fig. 19 Los diferentes tipos de disposición de los flagelos bacterianos.²³

Estructura Flagelar

El flagelo bacteriano consta de tres partes:

1. Filamento del flagelo, la parte más larga, que se extiende desde la superficie de la célula hasta la punta del flagelo.
2. El cuerpo basal, que se encuentra insertado en la célula.



3. El codo o gancho del flagelo, es un segmento corto y curvado, une al filamento a su cuerpo basal, actúa como una bisagra permitiendo al filamento orientarse en varias direcciones.

En las bacterias gramnegativas el flagelo consta de varios anillos, el L insertado en el LPS de la membrana, el P en el peptidoglucano y dos denominados S-M en la membrana citoplasmática. En las grampositivas solo hay dos anillos uno situado en la membrana y otro en el peptidoglucano.^{7, 18} (Fig. 20)

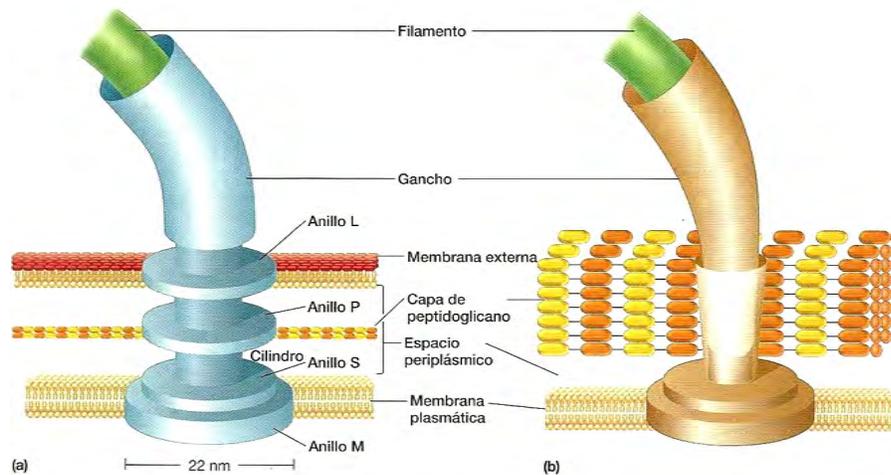


Fig. 20 Ultra estructura de los flagelos bacterianos.⁷

La síntesis de los flagelos bacterianos implica al menos 20 ó 30 genes. Además del gen de la flagelina, otros más codifican las proteínas del codo y del cuerpo basal.

A través del núcleo interno hueco del filamento las subunidades de flagelina se transportan, cuando alcanzan la punta las subunidades se agregan, su unión está dirigida por la proteína capuchón del filamento, de manera que el filamento crece por la punta en lugar de por la base. (Fig. 21)

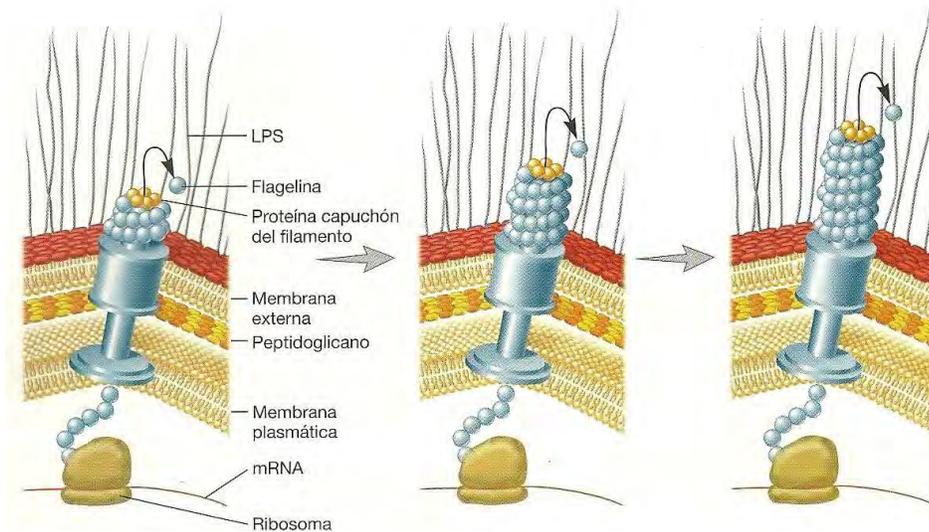


Fig. 21 Crecimiento del filamento del flagelo.⁷

Mecanismo de movimiento flagelar

El filamento tiene la forma de una hélice rígida, y la célula se mueve cuando esta hélice rota. La dirección de rotación del flagelo determina el tipo de movimiento de la bacteria. La rotación del filamento flagelar helicoidal empuja a la célula en una carrera hacia adelante quedando los flagelos en la parte posterior.

Para desplazarse hacia adelante, los flagelos rotan en sentido contrario a las manecillas del reloj, en este movimiento los codos se curvan para formar un haz rotante que propulsa a la célula hacia adelante. La rotación de los flagelos en el sentido de las manecillas del reloj deshace el haz y la célula gira.^{21, 24} (Fig. 22)

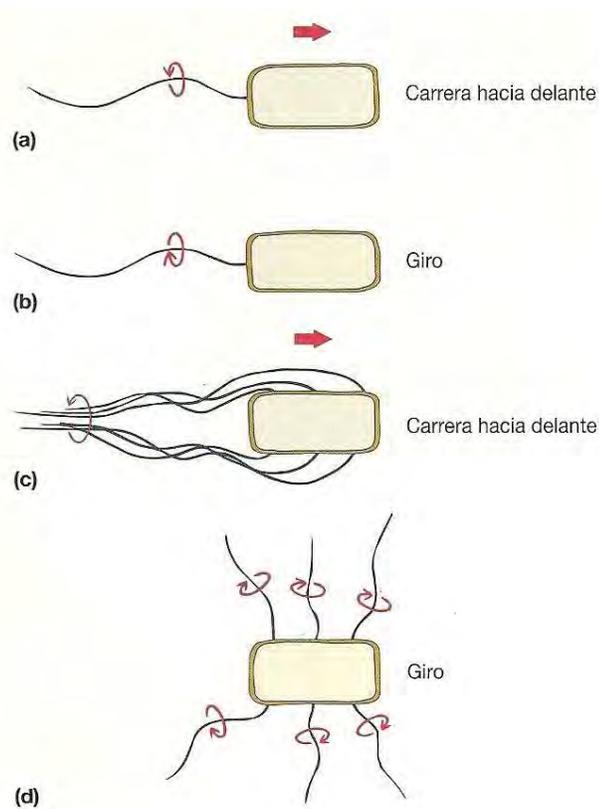


Fig. 22 Motilidad Flagelar. En esta imagen se ilustra la relación entre la rotación flagelar y el movimiento bacteriano.⁷

El cuerpo basal es una estructura pasiva y rota dentro de un complejo proteico insertado en la membrana, este movimiento está impulsado por gradientes de protones o de sodio no directamente de ATP. El flagelo es un aparato natatorio eficaz, lo cual facilita el desplazamiento de la bacteria por medios acuosos, logrando una velocidad de 20 a 90 $\mu\text{m}/\text{segundo}$.



PILI Y FIMBRIAS

Son vellosidades más cortas y rígidas que los flagelos, rectos que están implantados en la membrana citoplasmática. Pueden estar distribuidos en toda la superficie celular o ubicarse en uno o ambos polos de la célula.^{21, 25}

Dichas vellosidades están compuestas por una proteína denominada fimbrilina o pilina. Las fimbrias son finos tubos compuestos por subunidades proteicas, en su extremo se encuentran unas moléculas denominadas adhesinas que le determinan propiedades de adhesión. Además son también necesarias para la motilidad espasmódica que ocurre en algunas bacterias (fimbrias tipo IV).^{7, 26}

Los pili transmiten información genética, por lo que se les relaciona en casos de resistencia antimicrobiana. Son estructuras más largas y anchas que las fimbrias y terminan en especie de botón. La capacidad de emitir estos pilis se relaciona con la presencia de plásmidos. (Fig. 23)

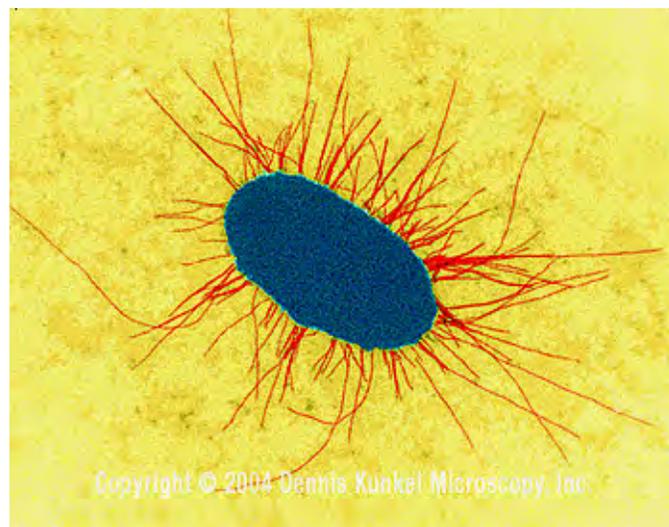


Fig. 23 *E. coli* con fimbrias.²⁷



Además de la movilidad que confieren los flagelos, algunos procariontes pueden moverse a lo largo de superficies sólidas por deslizamiento. Existen 2 mecanismos diferentes:

- Uno de ellos es mediado por pilis, consiste en la adherencia de estas vellosidades frente a la célula donde el pili es extendido y adherido a la superficie y luego retraído, de esta forma jalando a la célula.
- El otro tipo de deslizamiento es dado por la secreción de polisacáridos en la parte terminal de la célula, los cuales se unen a la superficie y al ser hidratados se expanden y empujan a la célula.

1.1.1 ENDOSPORA

Diversas bacterias grampositivas presentan la capacidad de formar una estructura latente de especial resistencia llamada endospora. Estas se desarrollan en el interior de las células bacterianas vegetativas de distintos géneros. Estas estructuras son muy resistentes a diversos factores ambientales como el calor, la radiación ultravioleta, la radiación gamma, desinfectantes químicos y la desecación.

Las endosporas permiten la supervivencia en situaciones de baja humedad o escasez de nutrientes. Puesto que la formación de la endospora, denominada esporogénesis o esporulación, se inicia normalmente cuando cesa el crecimiento debido a la ausencia de nutrientes.

La espora está rodeada por una delgada capa (exosporio) y debajo de esta se halla la cubierta de la espora formada por varias capas de proteínas. Esta



cubierta es impermeable a muchas moléculas tóxicas y es responsable de la resistencia de la espora a los compuestos químicos. Se sabe que está cubierta contiene enzimas implicadas en la germinación. La pared celular de la endospora está dentro del cortex y rodea el protoplasto o core de la endospora, este último contiene ribosomas y nucleóide, pero es metabólicamente inactivo.^{5,7} (Fig.24)

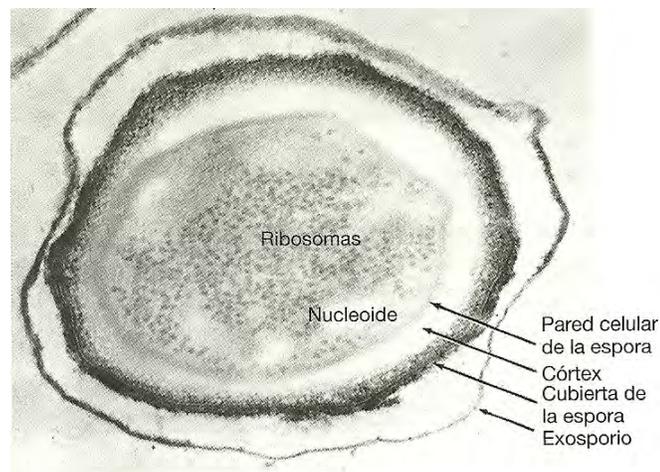


Fig. 24 Estructura de una endospora. Endospora de *Bacillus anthracis*.⁷

Parte de la composición de la endospora es de ácido dipicolínico que forma complejos con iones calcio en el protoplasto. Además en la endospora se hallan proteínas ácido-solubles de unión a DNA (SASP, small acid-soluble DNA-binding proteins).

Se desconoce aún el mecanismo exacto por el que la endospora es tan resistente a diferentes agentes ambientales, pero probablemente se deba a diversos factores como:

- Estabilización del DNA por el complejo dipicolinato cálcico y por proteínas ácido-solubles.



- Deshidratación del protoplasto
- Cubierta de la espora
- Reparación del DNA
- Mayor estabilidad de las proteínas celulares en bacterias adaptadas a crecer a temperaturas elevadas.^{7, 8}

1.1.2 GLUCOCÁLIX

El glucocáliz es una masa de fibras enredada, constituida por polisacáridos de moléculas ramificadas que se extiende desde la superficie bacteriana, y forman un compacto glucocáliz que rodea a las células individualmente o a una colonia de ellas.²⁸ (Fig. 25)

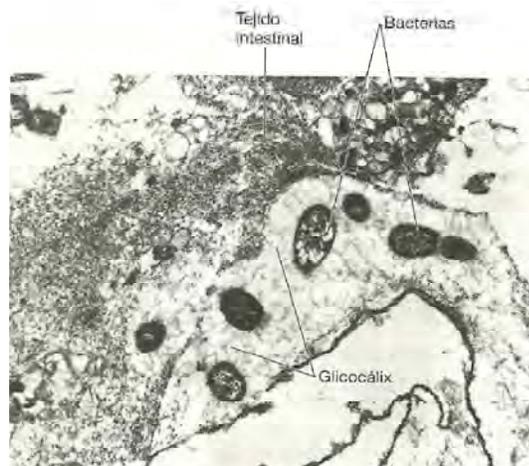


Fig. 25 Glucocáliz Bacteriano. En la imagen se observan bacterias conectadas entre sí, a través del glucocáliz que aparece como extensas redes de fibras que se extienden desde las células.⁷



Es generada en el interior de la célula y luego vertida al exterior, no es tan uniforme como la cápsula y está menos adherida a la pared celular. El glucocálix es una capa de aspecto gelatinoso y pegajoso.

Envuelve a la pared celular y dependiendo de su espesura y organización se denomina cápsula o capa limosa. Esta capa provee estabilidad mecánica al biofilm, mediante la adhesión a superficies formando cohesión, la red tridimensional de polímeros interconecta y paulatinamente inmoviliza a las células del biofilm.²⁹

Además la matriz del biofilm actúa como un sistema digestivo externo, acerca a las células enzimas extracelulares permitiéndoles metabolizar los desechos, coloides y polímeros sólidos.

El glucocálix brinda a las bacterias facilidad para adherirse a distintas superficies, como ocurre con *Streptococcus mutans*, que se une firmemente a la superficie libre de los dientes. (Fig. 26)

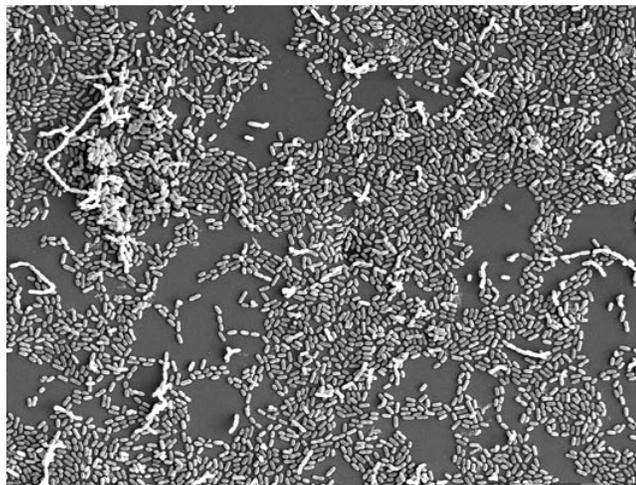


Fig. 26 Biofilm de *Streptococcus* en la cavidad oral.³⁰



Además representa una fuente de nutrientes, al impedir la salida de sustancias alimenticias.

1.2 MICROBIOTA BUCAL

La cavidad oral puede considerarse como un gran ecosistema, en el que existen microorganismos que interactúan entre sí, inmersos en un ambiente específico, con elementos abióticos que les circundan, con los que también se encuentran relacionados. La flora oral del ser humano es altamente compleja y diversa, varía de un sitio a otro.⁸

Adquisición de la microbiota oral

Antes del parto, el feto vive en un ambiente estéril, rodeado del líquido amniótico y la placenta; es en el momento del nacimiento, cuando se pone en contacto con distintos microorganismos.

Aproximadamente después de 8 horas, el número de bacterias en la cavidad oral de los neonatos incrementa, entre dichas bacterias se encuentran: *Lactobacilos*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Neisseria* y *Coliformes*. Sin embargo, muchas de estas bacterias solo están presentes transitoriamente y durante los primeros días. Los primeros en instalarse son *Streptococcus salivarius* en la mucosa, en la lengua y libres en la saliva.

La microbiota oral se va desarrollando conforme la edad, como se muestra en la tabla 1:



Tabla 1 Desarrollo de la microbiota oral.³¹

Edad	Organismos frecuentemente aislados
0 – 2 meses	<i>S. salivarius</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Veillonella spp.</i> ,
2 – 6 meses	<i>F. Nucleatum</i> , <i>Por. Catoniae</i> , <i>Leptotrichia spp.</i>
6 – 12 meses	<i>S. sanguis</i> , <i>Capnocytophaga spp.</i> , <i>Eik corrodens</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Actynomices spp.</i> , <i>A odontolyticus</i> .
12 meses – adolescencia	<i>S. mutans</i> , <i>Selenomonas spp.</i> , <i>Prev. nigrescens</i> , <i>Prev. intermedia</i> , <i>Prev. pallens</i> , <i>Por. Gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Adolescencia	Incremento de anaerobios y espiroquetas, en mujeres se incrementa <i>Prev. intermedia</i>

El medio bucal experimenta mayores cambios alrededor de los 6 meses de vida, momento del inicio de la erupción de la primera dentición.

La adquisición de la microbiota oral sigue un desarrollo ecológico denominado sucesión ecológica:

- Sucesión alogénica, el desarrollo de la microbiota está influido por factores no microbianos.



- Nacimiento, erupción de los dientes, vida adulta, pérdida dentaria, uso de prótesis.
- Sucesión autogénica, en esta situación la modificación de la microbiota se da por factores microbianos.

Naturaleza de la microbiota oral

Se han identificado 700 especies bacterianas distintas en la cavidad oral, de las cuales 400 se han encontrado en bolsas periodontales, las 300 restantes se han identificado en otros sitios de la boca, como: la lengua, mucosas, lesiones cariosas e infecciones endodónticas.^{32, 33} La mayoría tienen la característica de ser transitorias, de forma que como residentes solo quedarían 20 cepas aproximadamente.

La cavidad oral y tejidos de soporte están mediados por condiciones bacterianas que involucran el desequilibrio en la flora normal. La saliva es un regulador de la flora microbiana oral, sirve como ambiente, medio de cultivo de microorganismos y como regulador.³¹

- Cocos grampositivos: *Streptococcus viridans* en su mayoría, en menor proporción se hallarían, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *S. mucilaginosus*, *Abiotrophia* spp., y los aerobios estrictos *Peptostreptococcus* spp.
- Cocos gramnegativos: se han detectado diversas especies aerobias y comensales no estrictas, del género *Neisseria*. Y como anaerobias estrictas *Veillonella*.



- Bacilos grampositivos: Destacan en cantidad *Actinomyces* y *Lactobacillus*, en menor cantidad se encuentran, *Corynebacterium matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, *Propionibacterium* y las pertenecientes al género anaerbio *Eubacterium* y *Bifidobacterium*.
- Bacilos gramnegativos: Del género anaerobios estrictos no esporulados se encuentran, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia bucalis*, *Selenomonas* spp., y *Centipeda periodontii*. Del grupo de anaerobias facultativas se encuentran: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus* spp., *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* spp., y algunas especies del género *Campylobacter*.³⁴
- Otros microorganismos: Treponemas comensales, hongos (*Candida* spp.), *Mycoplasma* spp., y escasos protozoos como las especies *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*.^{8, 31}



2. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL BIOFILM

Durante los últimos años la estructura del biofilm ha sido estudiada, y actualmente se ha revelado una estructura tridimensional completa en forma de setas o también llamado modelo de los canales de agua. Por medio de los canales los fluidos ambientales pueden moverse transportando nutrientes, agua, oxígeno, removiendo productos de desecho y actuando como conductos para moléculas mensajeras, incluso hasta las zonas más profundas del biofilm.

Sin embargo estos canales no evitan que dentro del biofilm puedan existir ambientes diferentes en los que las concentraciones de nutrientes, oxígeno y pH son distintas.^{35, 36, 37}

Para la formación de un biofilm se requiere de nutrientes y de una variedad de factores físico – químicos, como pH, temperatura, osmolaridad, luz, tensión de oxígeno.

2.1 FACTORES NUTRICIONALES

Para que las bacterias se desarrollen deben encontrar compuestos químicos necesarios, que les provean nutrientes para llevar a cabo la síntesis de sus componentes celulares.

Los nutrientes son sustancias empleadas para la biosíntesis y la obtención de energía, por tanto son necesarios para el crecimiento bacteriano.



La bacteria requiere cantidades grandes de macronutrientes; como carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo, estos se encuentran formando parte de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Sin embargo requiere una pequeña cantidad de micronutrientes, aún así estos últimos son indispensables, estas moléculas forman parte de cofactores enzimáticos e intervienen en reacciones catabólicas y contribuyen al mantenimiento de la estructura de proteínas.

El carbono es necesario para la construcción de todas las moléculas orgánicas. El movimiento de electrones a través de la cadena de electrones y durante reacciones de óxido-reducción proporciona energía, además los electrones son necesarios para la síntesis de moléculas durante la biosíntesis. El nitrógeno es necesario para la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y cofactores enzimáticos. El fósforo está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos (como el ATP), varios cofactores y algunas proteínas. La mayoría de los microorganismos utilizan el fósforo inorgánico como fuente de fósforo y lo incorporan directamente. El azufre es necesario para la síntesis de sustancias como aminoácidos, cisteína y metionina, algunos carbohidratos, biotina y tiamina. Las bacterias utilizan al sulfato como fuente de azufre.

Los microorganismos requieren una mezcla equilibrada de nutrientes, si un nutriente esencial es escaso, el crecimiento microbiano se verá limitado, independientemente de la concentración de los demás nutrientes.

2.2 pH

Muchas especies bacterianas tienen un rango de pH para su crecimiento, la mayoría de las bacterias crecen mejor a un pH próximo al neutro o



ligeramente alcalino (7.2 – 7.6); sin embargo algunas se desarrollan mejor en medios ácidos (acidófilas) e incluso son capaces de seguir bajando el pH. En cambio otras bacterias son muy sensibles a la acidez y toleran bien ambientes alcalinos.

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.³⁸

2.3 NECESIDADES DE OXÍGENO

La importancia del oxígeno para el crecimiento de un organismo está directamente relacionada con su metabolismo; particularmente con los procesos que emplea para conservar la energía que ha obtenido.³⁹

Las condiciones atmosféricas para un microorganismo están dadas por el potencial de óxido – reducción. Lo que se conoce como respiración bacteriana consiste en reacciones en cadena donde varía el aceptor final de electrones o de hidrógeno.

El balance energético de un microorganismo depende de su equipo enzimático, aquel microorganismo que utilice el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (respiración aerobia) obtendrá gran cantidad de energía, y el que se vale de sustancias orgánicas como aceptores finales de electrones (fermentación) obtendrá poca cantidad de energía.

Las bacterias se clasifican de acuerdo a su necesidad y sensibilidad al oxígeno:

- Anaerobias estrictas: crecen solo en ausencia de oxígeno, o en ambientes con una tensión de oxígeno (pO_2) mayor del 0.5%



- Anaerobias moderadas: son capaces de crecer en presencia de un 2 a 8% de oxígeno, pueden sobrevivir expuestas al oxígeno atmosférico (20%) durante 60 a 90 minutos.
- Anaerobias aerotolerantes: pueden tolerar el oxígeno, pero son incapaces de utilizarlo metabólicamente.
- Anaerobias facultativas: no precisa el oxígeno para su desarrollo, pero pueden utilizarlo metabólicamente.
- Microaerófilas: requieren de oxígeno pero en concentraciones inferiores a las atmosféricas (2 – 10%).
- Aerobias estrictas: para su crecimiento necesitan oxígeno y no pueden desarrollarse en su ausencia (20%).⁸ (Fig. 27)

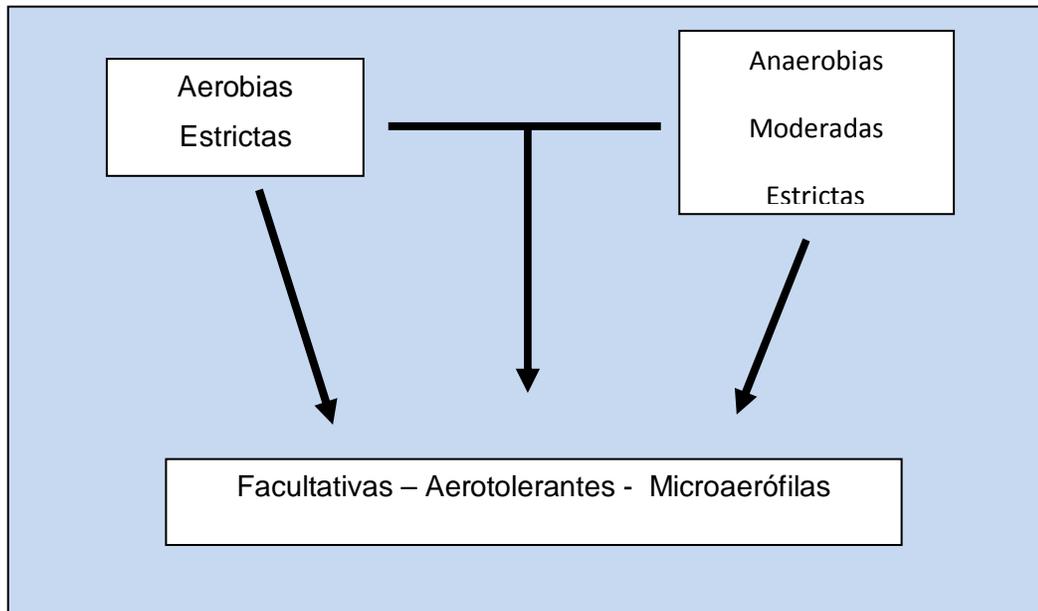


Fig. 27 Clasificación de las bacterias en cuanto al efecto del O₂ sobre su metabolismo.¹¹



La mayoría de las bacterias ven favorecido su crecimiento por la presencia de pequeñas cantidades de CO₂ (0.03%) que es proporcionado por la atmósfera, o el que es obtenido de reacciones de oxidación y fermentación de la propia célula. En cambio otras bacterias necesitan concentraciones elevadas de CO₂ (5 – 10%), estas bacterias son llamadas capnófilas.

El hongo oportunista *Candida albicans*, a pesar de crecer en condiciones aeróbicas y anerobias solo es capaz de formar biofilms, en presencia de oxígeno,⁴⁰ por lo cual el oxígeno es un factor determinante en el establecimiento del biofilm para algunos microorganismos.

2.4 TEMPERATURA

La temperatura de los microorganismos varía con la de su medio ambiente externo. El efecto de la temperatura tiene gran impacto en el crecimiento de las bacterias, debido a la sensibilidad que presentan las reacciones enzimáticas ante este factor.

Las enzimas a una temperatura adecuada funcionan de manera óptima, a una temperatura menor de la óptima las enzimas dejan de ser catalíticas y a medida que la temperatura asciende la velocidad de reacción se incrementa. De acuerdo a lo anterior se establece que a medida que aumenta la velocidad de cada reacción, el metabolismo se acelera y el microorganismo crece más de prisa. (Fig. 28)

Sin embargo a partir de cierto punto, el aumento de la temperatura óptima podría retrasar el crecimiento, esto es debido a que se desnaturalizan enzimas, transportadores y otras proteínas, además de que la bicapa lipídica puede desintegrarse. Cuando la temperatura es menor a la óptima podría



afectarse la función, pero no necesariamente la composición química y la estructura de la célula.

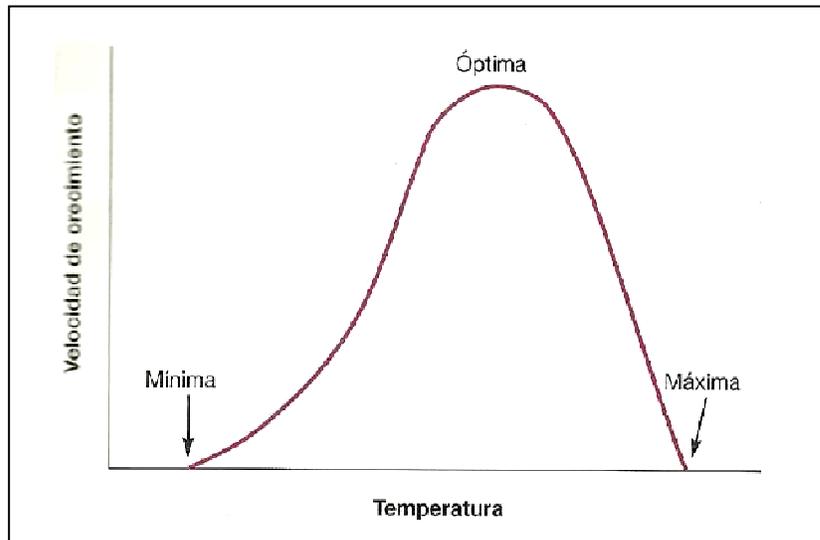


Fig. 28 Temperatura y crecimiento. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento.⁷

Las bacterias se clasifican en tres categorías fundamentales según los márgenes de temperatura en los que se puede desarrollar óptimamente:

- Psicrófilos: Este tipo de bacterias pueden desarrollarse en bajas temperaturas (0°C), tienen una temperatura óptima menor o igual a 15°C .
- Psicrófilos facultativos: Este tipo de bacterias pueden desarrollarse en temperaturas entre $0 - 7^{\circ}\text{C}$, tienen valores óptimos de $20 - 30^{\circ}\text{C}$, y máximos de 35°C .
- Mesófilos: Estos microorganismos se producen entre $20 - 40^{\circ}\text{C}$ con una temperatura óptima de 36°C , las bacterias que se relacionan a la patogénesis en el hombre pertenecen a este grupo.



- Termófilos: estos microorganismos toleran temperaturas altas, la temperatura óptima para su desarrollo es de 55°C y la máxima de 80°C.
- Hipertermófilos: Estas bacterias se desarrollan óptimamente a temperaturas elevadas que oscilan de 80 – 113°C. no suelen crecer bien por debajo de 55°C.^{7, 41} (Fig. 29)

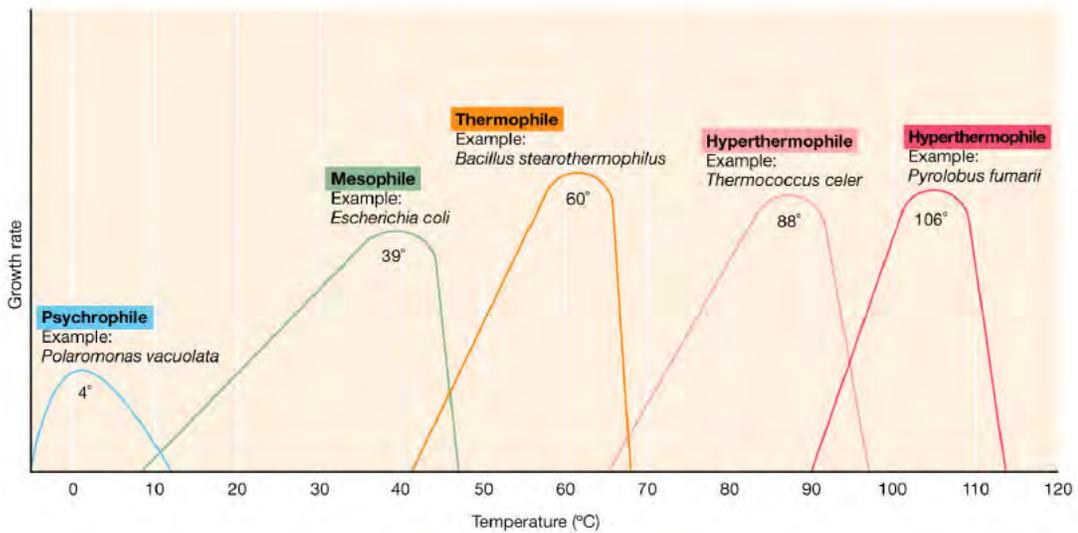


Fig. 29 Clasificación de microorganismos según la temperatura óptima de desarrollo.⁴²



3. BIOPELÍCULAS BACTERIANAS

Las bacterias se organizan en complejos y tenaces entramados o películas biológicas –biopelículas-, cuando los microorganismos utilizan esta formación la comunicación entre ellas es vital.

Investigaciones médicas (Jonh R. Lawrence, Douglas E. Caldwell y Costerton, 1991) han demostrado que las bacterias crecen en microcolonias, éstas se encuentran inmersas en una sustancia espesa, a la que se llama matriz extracelular o glucocálix, que las mantiene unidas. Esta sustancia blanda y pegajosa es secretada por ellas, invariablemente absorbe agua y atrapa partículas pequeñas.⁴³ (Fig. 30)

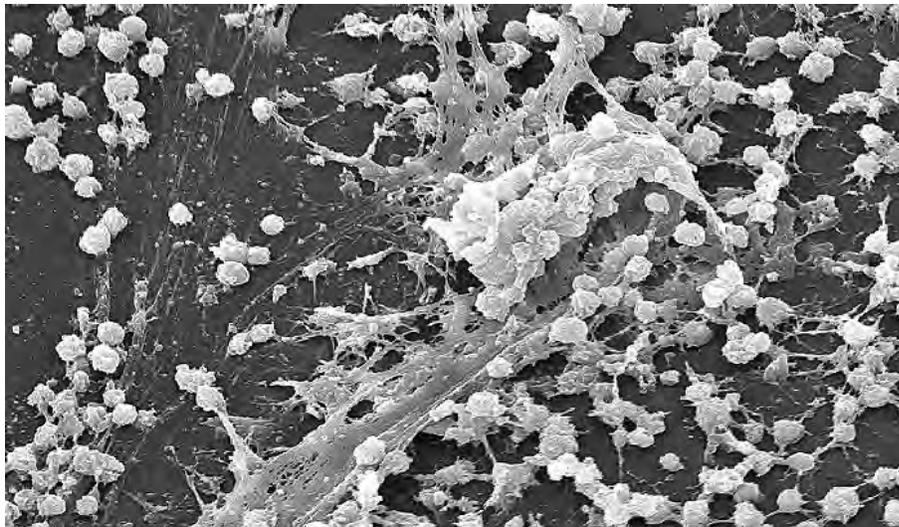


Fig. 30 Imagen del biofilm de *Staphylococcus*, se observa a la sustancia matriz polisacárida extracelular rodeando y encapsulando las células bacterianas.⁴⁴



Una biopelícula está constituida por infinidad de estos grupúsculos, separados por una red de canales de agua. El líquido que fluye por estos minúsculos conductos baña cada congregación microbiana, aportando nutrientes disueltos y eliminando productos de desecho.

Las células situadas en la periferia de la microcolonia están bien servidas por el sistema de canales, mientras que las del interior son sometidas a un bajo y restringido suministro. La densa agregación de células que las rodea y la matriz orgánica que las mantiene unidas actúan de barrera para el flujo de agua. Las células del centro de la colonia tienen que sobrevivir por tanto con los nutrientes que se difundan hacia ellas; a pesar de ello el suministro no es completamente nulo.^{43, 45} (Fig. 31)

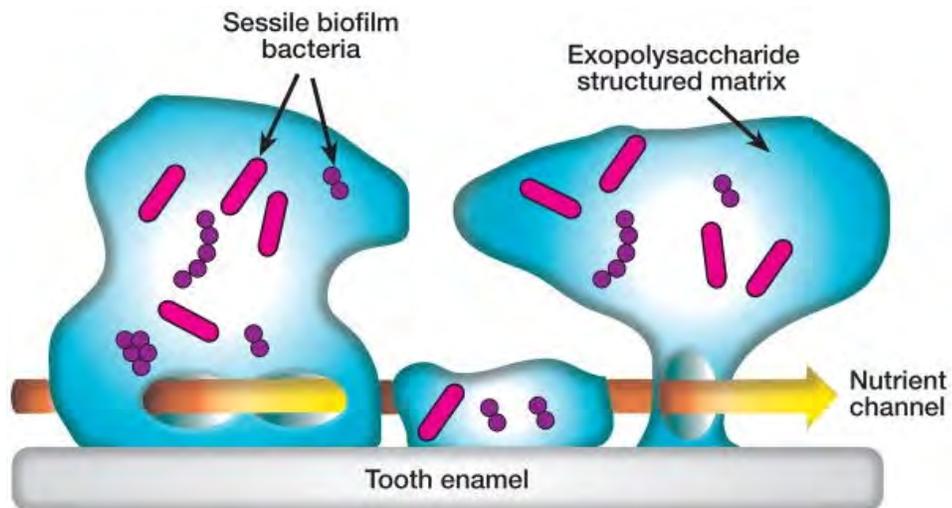


Fig. 31 Estructura del Biofilm.⁴⁶

Debido a la consistencia de la matriz extracelular las moléculas pequeñas pueden moverse libremente. A las sustancias que reaccionan con la matriz extracelular o con la célula se les dificultará el paso al interior de la microcolonia.



La diversidad de ambientes químicos que surgen dentro de una misma biopelícula influye en el aspecto que presente una célula y su modo de actuar respecto a otra aunque sean genéticamente idénticas. Las condiciones locales regulan también la producción de toxinas por lo cual algunas bacterias son más patógenas que otras.

La diversidad de ambientes químicos puede permitir que varias especies bacterianas vivan al lado de otras sin problemas, en ocasiones una de ellas se alimenta de los desechos metabólicos de la otra, de modo que ambas se ayudan.

3.1 FORMACIÓN DE BIOFILM

Para el desarrollo óptimo de las biopelículas se requiere de una serie de pasos altamente regulados, donde influyen factores ambientales, biológicos y físicos. Se sabe que el mecanismo genético – molecular de la formación de biopelículas depende de cada microorganismo, sin embargo las etapas de desarrollo de las biopelículas se conserva entre una amplia gama de microorganismos.⁴⁷

Estas etapas consisten en un ciclo que incluye:

- Depósito y organización en grupos de células bacterianas sobre una superficie.
- Segregación de la matriz extracelular por las células agrupadas, formación del glucocálix.
- Las células intercambian señales para multiplicarse y formar una microcolonia.



- Aparecen gradientes químicos, que favorece la coexistencia con otras especies bacterianas y con los distintos estados metabólicos.^{43, 47}
(Fig. 32)

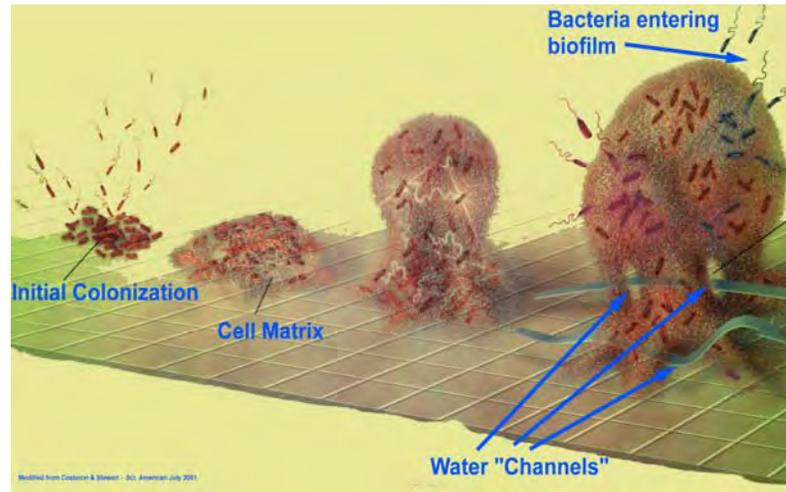


Fig. 32 Formación de biopelículas.⁴⁸

- Finalmente se produce la dispersión de algunas células, estas se despegan, vuelven a su estado libre, posiblemente para formar nuevos agregados. (Fig. 33)

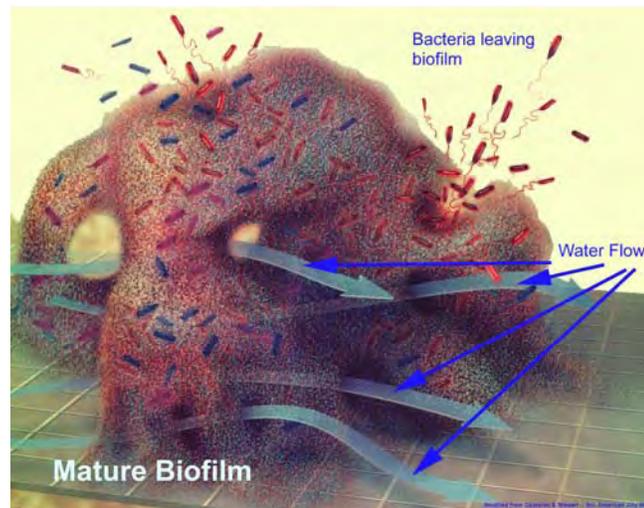


Fig. 33 Dispersión de algunas células bacterias para formar nuevos agregados.⁴⁸



3.1.1 FORMACIÓN DE BIOFILM A PARTIR DE UNA CÉLULA PLANCTÓNICA.

Existen algunas bacterias que se encuentran libremente flotando en medios acuosos de manera individual (bacterias planctónicas). (Fig. 34)

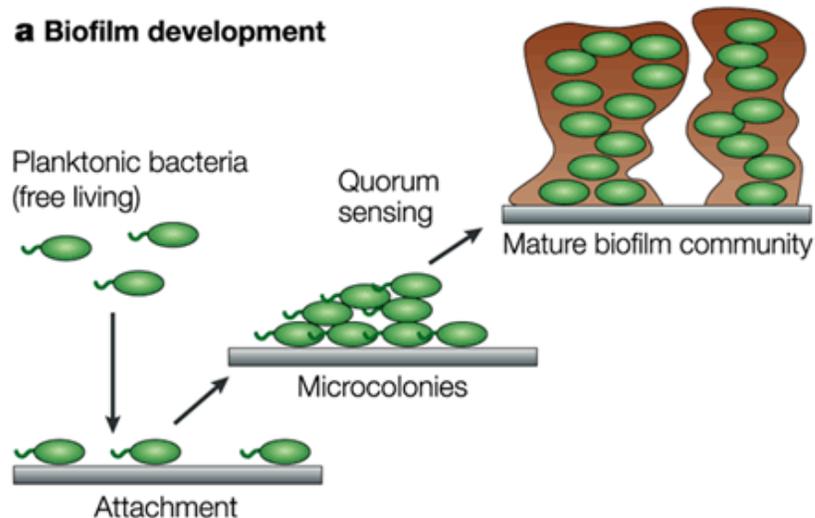


Fig. 34 Desarrollo de Biofilm a partir de una bacteria Planctónica.⁴⁹

Estas bacterias tienen características muy diferentes a las de sus contrapartes adherentes. Presentan superficies hidrofílicas y el patrón de expresión genética es diferente al de las bacterias que crecen sobre una superficie. Este tipo de bacterias no forma un glucocálix, por lo que son más susceptibles a agentes antibacterianos, como antimicrobianos. Paradójicamente la mayoría de los estudios de antimicrobianos están basados en experimentos con bacterias planctónicas. Estas bacterias presentan gran variedad de velocidades de crecimiento, debido a su fenotipo.

Son también susceptibles a la erradicación por el sistema inmune. La observación de varias bacterias patógenas ha demostrado que una vez en el



hospedero este tipo de bacterias adopta ciertas estrategias para evadir la reacción del huésped. Dichas estrategias incluyen la formación de microcolonias y elaboración de glucocálix. (Fig. 35)

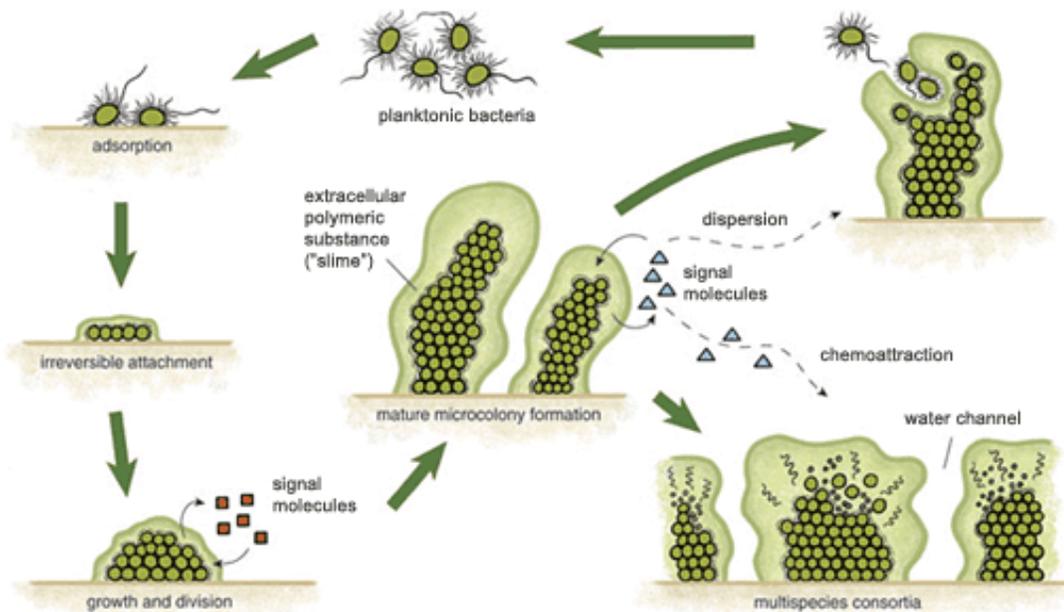


Fig. 35 Formación de una biopelícula, a partir de una bacteria planctónica. La formación comienza cuando las bacterias planctónicas que nadan libremente se adsorben sobre una superficie biótica o inerte, esta asociación, al principio reversible, luego se vuelve irreversible. La adsorción desencadena los primeros cambios fisiológicos que conducen al estilo biológico de la película.⁴⁵



3.2 UNIÓN A LA SUPERFICIE

La adherencia es una propiedad de gran número de bacterias que les permite su fijación a la superficie de las células y aún de materiales inertes.

Inicialmente las células se aproximan al sustrato para adherirse, en algunos casos la motilidad es importante e indispensable para este proceso. En este paso inicia la interacción del microorganismo y la superficie, durante esta etapa son imprescindibles el uso de sus apéndices bacterianos como: flagelos, fimbrias y pilis. Se ha detectado en varias especies bucales, fimbrias entre los cuales se encuentran: *A naeslundii*, *P gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y algunas cepas de *Streptococcus*, como: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis* y miembros del grupo de *Streptococcus mitis*.⁵⁰ (Fig. 36)

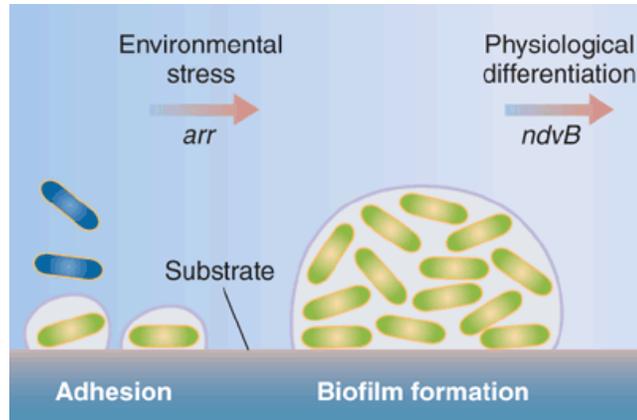


Fig. 36 Adhesión bacteriana.⁵¹

Además de las interacciones entre la célula y su superficie, se desarrollan otras entre célula – célula, participando también fimbrias y algunas adhesinas, las cuales permiten el establecimiento de microcolonias.



Por otro lado la interface sólido – líquido que se encuentra entre la superficie y un medio acuoso (agua o sangre) provee un ambiente ideal para la adhesión y crecimiento de microcolonias.

La adhesión depende también de la naturaleza de la superficie, pues se ha observado que si ésta es áspera la adhesión aumenta o se facilita. De este modo las propiedades fisicoquímicas de la superficie influyen en la velocidad de formación del biofilm y en la extensión de éste. Puesto que los microorganismos se unen más rápido a superficies hidrofóbicas no polares, como el teflón y otros plásticos que a superficies hidrofílicas como el vidrio o metales.⁵² Se ha observado también que por las interacciones entre las superficies hidrofóbicas y los microorganismos éstos pueden adherirse de manera irreversible. (Fig. 37)

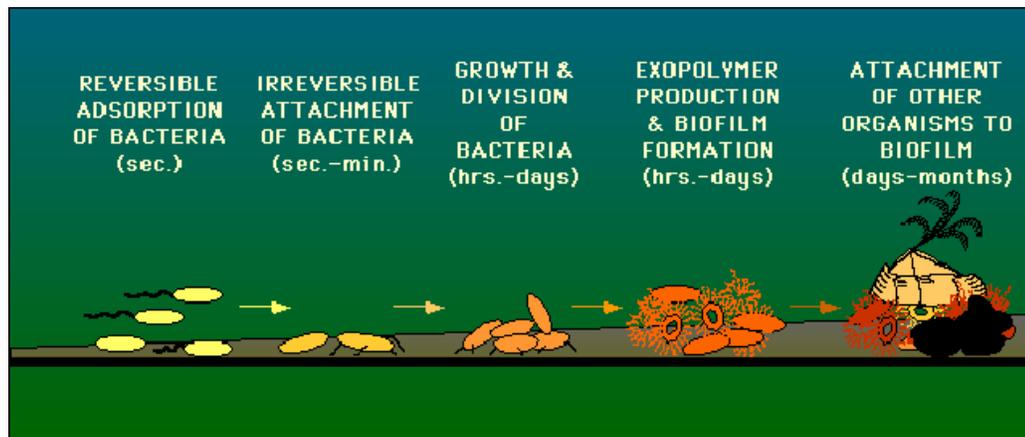


Fig. 37 La formación del Biofilm se produce por la adherencia específica de especies bacterianas, después estas bacterias segregan exopolisacáridos para formar un compacto glucocálix que le brinda nutrición y un medio de protección a la microcolonia bacteriana.⁵³

Asimismo la adhesión se ve influenciada por el acondicionamiento de la superficie debido a que ésta se cubre de polímeros provenientes del medio



que modifican químicamente a la superficie. Como ejemplo se toma el esmalte de los dientes en la cavidad oral, éste es cubierto por albúmina, lizosimas, glicoproteínas, fosfoproteínas, lípidos y fluidos gingivales.^{54, 55}

La superficie de los labios, carrillos, paladar, lengua, encía y dientes, proveen todas las características para la colonización bacteriana. Todas estas estructuras están cubiertas por una película confluyente altamente hidrófila de mucinas salivales. Estas mucinas tienen la forma de un gel hidratado complejo que puede ser de importancia en la lubricación de la mucosa, en la protección contra cambios súbitos de la presión osmótica; pero también influye en la adherencia microbiana.

La diferencia más importante entre las superficies bucales, es dada entre la mucosa, con su epitelio descamante y la superficie dentaria sólida. En las superficies que presentan descamación las bacterias deben colonizar continuamente la superficie que se desprende de la mucosa bucal, lo anterior es una parte importante en la defensa del huésped contra la invasión microbiana.

El pH, los niveles de nutrientes, la fuerza iónica y la temperatura influyen en la adhesión de las bacterias a la superficie; así como la hidrofobicidad que posea la célula bacteriana, debido a la presencia de fimbrias, pilis y flagelos, la producción de exopolisacáridos y otras proteínas de superficie, tales como finas fibrillas poliméricas extracelulares y los LPS, influyen también en la adhesión.

Uno de los componentes principales para la formación de biopelículas son los polisacáridos extracelulares que se han clasificado en polisacáridos capsulares o exopolisacáridos, que determinan la arquitectura del biofilm.⁵⁶



Las fimbrias, proteínas y los EPS ayudan a la adhesión a superficies hidrofóbicas por ser no polares, por su parte los LPS son útiles en la adherencia a superficies hidrofílicas. El flagelo tiene un papel importante en la adhesión ya que supera fuerzas repulsivas más que actuar como absorbente o adhesivo.⁵² (Fig. 38)

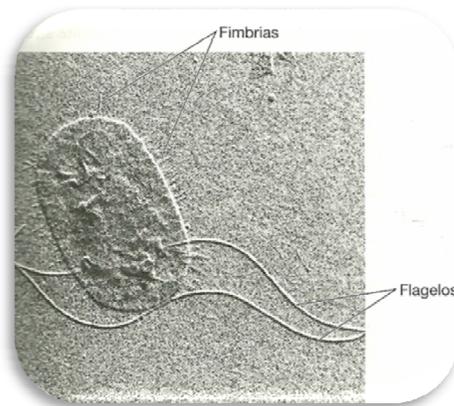


Fig. 38 En esta micrografía electrónica de la bacteria *Proteus vulgaris* se observan los largos flagelos y las numerosas fimbrias.⁷

La adherencia es un fenómeno específico, como consecuencia de la combinación de sustancias presentes en la superficie de la bacteria o adhesinas con receptores en la superficie de las células.

ADHESINAS

Son compuestos de la superficie de la bacteria que actúan de mediadores del fenómeno de adherencia.

Algunos estudios realizados han permitido demostrar que las adhesinas se encuentran asociadas con estructuras superficiales como: fimbrias, pilis, glucocálix y con diversos componentes de la membrana externa (proteínas,



lipopolisacáridos). Pueden ser de naturaleza proteica, hidrocarbonada y lipídica.⁴¹ (Fig. 39)

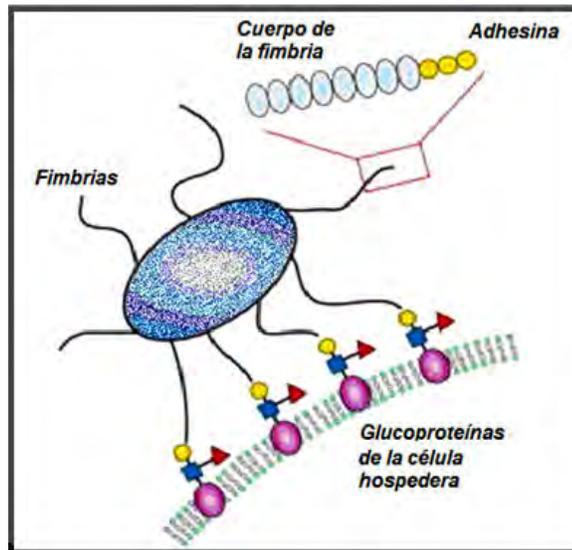


Fig. 39 las adhesinas son parte constitutiva de una fimbria y las moléculas encargadas de asegurar la adhesión de esa estructura a su receptor en la célula hospedera.⁵⁷

La adherencia requiere el contacto de la bacteria con la célula, pero como ambas superficies son electronegativas, se crea una fuerza de repulsión, que solo es neutralizada en parte por débiles fuerzas de atracción (fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas), lo que genera la formación de una barrera electrostática que dificulta la aproximación. La presencia en la superficie de la bacteria de moléculas hidrofóbicas y en especial de adhesinas, que por su pequeño tamaño no están sujetas a estas fuerzas de repulsión, permiten neutralizar esta barrera y facilitar el contacto.^{26, 41}

Las adhesinas bacterianas se combinan específicamente con compuestos existentes en la superficie de células animales, llamados receptores. (Fig. 40)

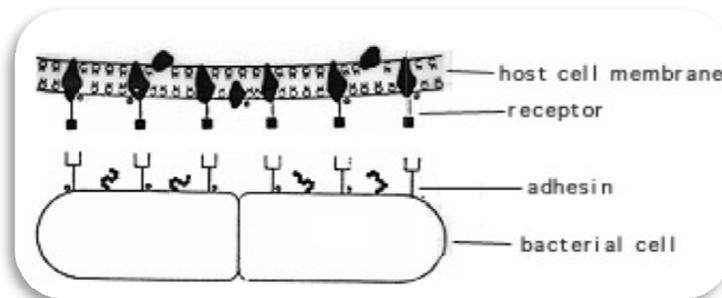


Fig. 40 La adhesión implica interacciones químicas específicas entre la célula huésped o de la superficie del tejido y la superficie bacteriana. Esto se lleva a cabo a través de adhesinas y receptores específicos.⁵³

En bacterias gramnegativas, la adherencia es debida generalmente a la presencia de adhesinas en las fimbrias o en estructuras de la membrana externa. Mientras que en las bacterias grampositivas la adherencia se encuentra asociada a otros mecanismos, especialmente con la presencia de ácido lipoteicoico, glucocálix u otras estructuras en la superficie de la bacteria.

El glucocálix proporciona también adherencia, de este modo las bacterias pueden fijarse tenazmente y a menudo con gran especificidad a distintas superficies. La adherencia dada por el glucocálix da lugar a la formación de hábitats especializados de bacterias en muchos ecosistemas naturales; por tanto la formación del glucocálix es un determinante crítico para la iniciación y progresión de varias enfermedades, como la caries dental.²⁸

3.3 FORMACIÓN DE MICROCOLONIAS

Las bacterias se desarrollan en grupos formados por multitudes que se adhieren a las superficies. Las bacterias al detectar ciertos parámetros



ambientales favorables y valiéndose de sus apéndices como: flagelos y pilis, se mueven a lo largo de la superficie hasta encontrar otras bacterias formando microcolonias, sobre las cuales se desarrolla el crecimiento.

Los biofilms no son capas de células depositadas acumulativamente, son heterogéneos y contienen microcolonias de células bacterianas encapsuladas en una matriz de EPS separadas de otras microcolonias por los canales intersticiales por donde se difunden nutrientes, oxígeno y otros agentes externos. (Fig. 41)

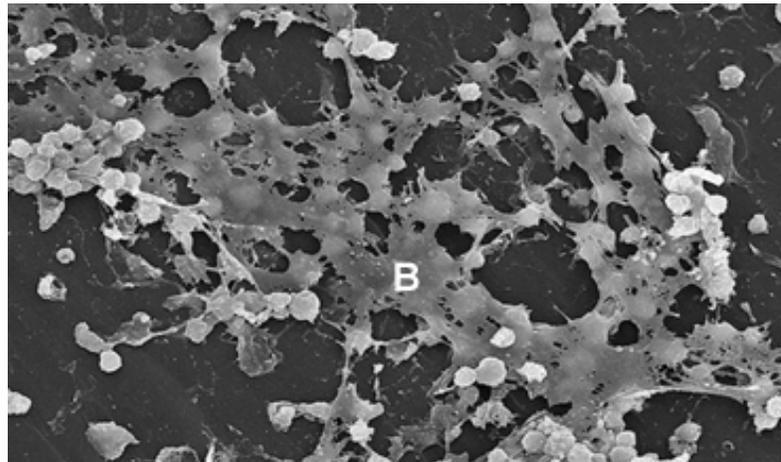


Fig. 41 En la imagen de barrido de microscopía electrónica se muestra la formación del biofilm de *Staphylococcus aureus*.⁵⁸

3.4 CRECIMIENTO DEL BIOFILM

Durante la etapa de crecimiento, las bacterias comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar exopolisacáridos que constituyen la



matriz del biofilm, éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas.⁵⁹

La arquitectura del biofilm es heterogénea en espacio y tiempo, ya que constantemente hay cambios internos y externos. La motilidad de las bacterias genera la migración de células de una microcolonia a otra, y por tanto la estructura de la microcolonia cambia para hacerse más compacta. (Fig. 42)

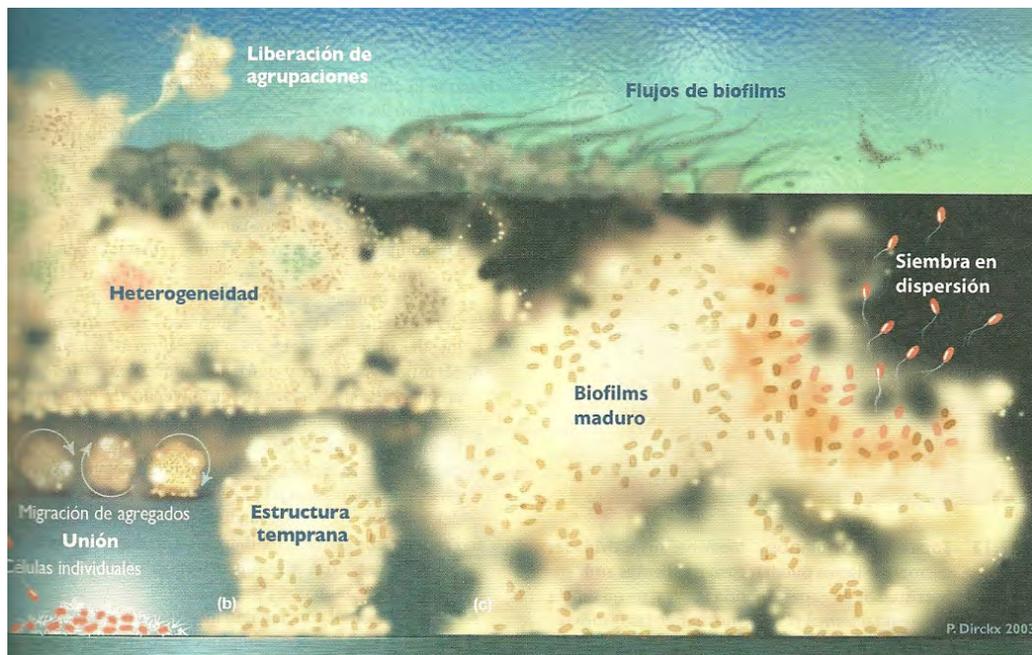


Fig. 42 El crecimiento de Biofilms. Los Biofilms o crecimiento microbiano en superficies como en ambientes de agua dulce o marinos, pueden desarrollarse y llegar a ser extremadamente complejos, dependiendo de las fuentes de energía que están disponibles.⁷



3.5 MADURACIÓN DEL BIOFILM

Los gradientes de nutrientes, productos de desecho, factores de señalización, hacen que el biofilm sea heterogéneo. Los biofilm maduros demuestran una estructura tridimensional compleja con numerosos microambientes que difieren en osmolaridad, el acceso a los nutrientes y en la densidad celular. La heterogeneidad produce una variedad de fenotipos dentro de los biofilms,⁶⁰ además en el interior del biofilm las células exhiben un patrón de expresión genética diferente. Después de la adhesión las microcolonias maduran y se genera una matriz extracelular que presenta una señalización dentro del biofilm.⁶¹ (Fig. 43)

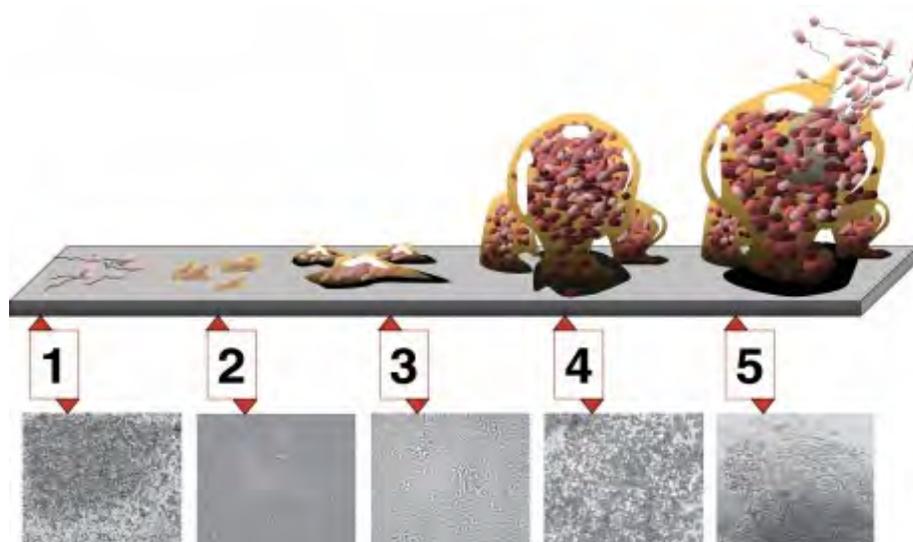


Fig. 43 Maduración del Biofilm.⁶²

3.6 DISGREGACIÓN DEL BIOFILM MADURO

Este proceso se da por los niveles de nutrientes, concentración celular, efectos del flujo continuo del medio, cambios en los niveles de oxígeno o pH,



también por la acción de enzimas que disgregan los componentes de la matriz como las polisacárido liasas o las DNAsas, así como la motilidad involucrada en la dispersión del biofilm, generando la disolución de las microcolonias.^{63, 64}

La disgregación para las bacterias formadoras de biofilm es importante debido a que de esta manera se diseminan las infecciones.⁶⁵

En el caso de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se ha observado que el polisacárido O de los lipopolisacáridos se requiere para la disgregación de las células, provocando el desprendimiento de células bacterianas para formar nuevas microcolonias, permitiendo la dispersión del biofilm y la población de nuevas superficies. La disgregación en este tipo de bacteria se da también por la proteína DsPB.

En el caso de *Streptococcus mutans* la dispersión de las células se da por la presencia de una proteína de superficie llamada proteína de desintegración celular.⁶⁶ (Fig. 44)

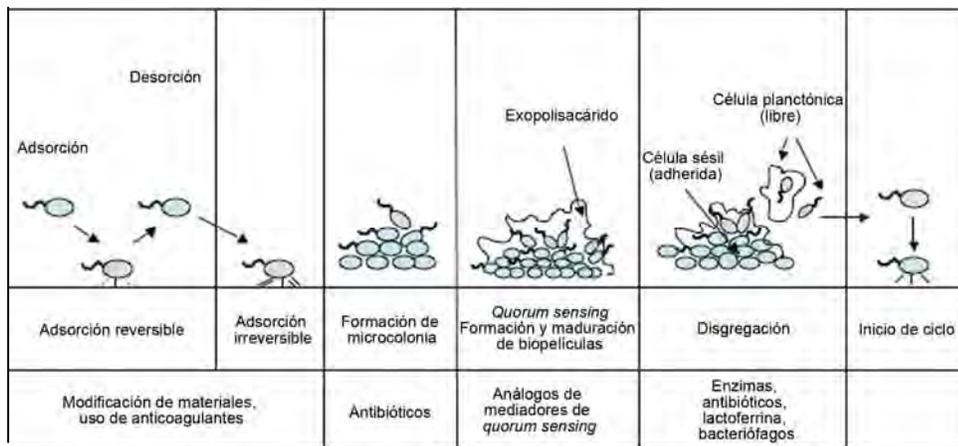


Fig. 44 Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión. La formación de biopelículas se realiza mediante una serie de eventos secuenciales.⁶⁷



3.7 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DENTAL

La biopelícula dental es una comunidad microbiana asociada a una superficie dentaria o con cualquier otro material duro no descamativo. Generalmente en las zonas más profundas de las biopelículas se concentra una capa densa de microorganismos que conforman una matriz de polisacáridos con otros materiales orgánicos e inorgánicos.⁵⁰

El proceso de formación de la biopelícula dental se divide en tres fases principales:

- Formación de la película sobre la superficie dental
- Adhesión inicial y fijación de las bacterias
- Colonización y maduración de la placa

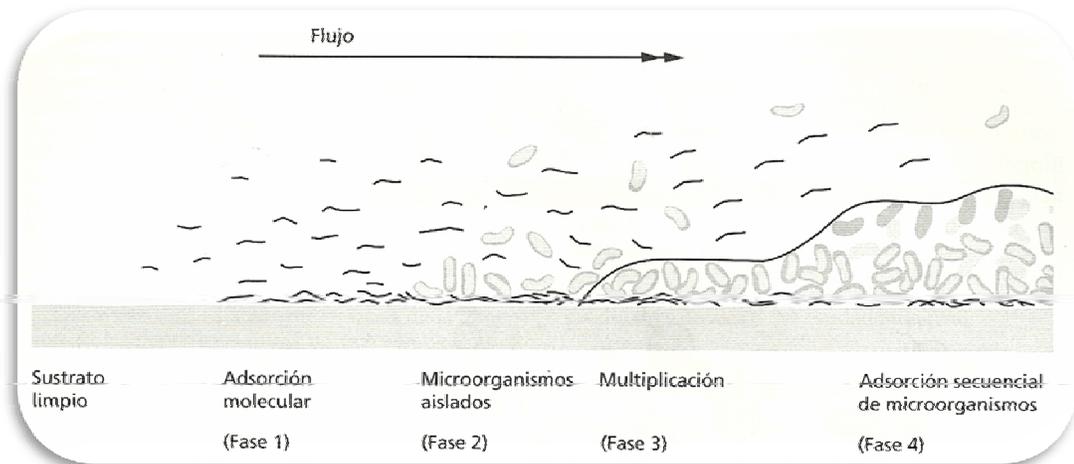


Fig. 45 Etapas de la formación de una biopelícula sobre una superficie limpia, dura y no descamativa después de la inmersión en un medio líquido.⁵⁰



FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Todas las superficies de la cavidad oral tanto tejidos duros como blandos, están cubiertas con una película (fase inicial del desarrollo de la placa). Segundos después de realizar el cepillado dental, macromoléculas hidrófobas comienzan a adsorberse a la superficie para formar una película condicionante, esta capa delgada derivada de la saliva, es denominada película adquirida y cubre la superficie dental. Esta película consta de varios componentes, incluidos glucoproteínas (mucinas), proteínas ricas en prolina, fosfoproteínas, proteínas ricas en histidina, enzimas como la amilasa y otras moléculas que funcionan como sitios de adhesión para las bacterias (receptores), además altera la carga y la energía libre de la superficie, aumentando la eficiencia de la adhesión bacteriana.⁶⁸

Estudios actuales han comprobado que las bacterias pueden ser parte del depósito inicial incluso pocos segundos después de la profilaxis. Enuncian también que la película inicial de esmalte (2 horas) debido a su composición de aminoácidos difiere de la saliva, lo que indica que la película se forma por medio de absorción selectiva de macromoléculas del ambiente. En la formación de película de esmalte interfieren las fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas.

ADHESIÓN INICIAL Y FIJACIÓN DE BACTERIAS

Fase 1: Transporte a la superficie. La bacteria se transporta a la superficie dental. Puede darse contactos aleatorios por medio del movimiento browniano, la sedimentación de microorganismos, el flujo de líquido o a través del movimiento bacteriano activo.



Fase 2: Adhesión inicial. Esta etapa lleva a una adherencia reversible de la bacteria, se inicia por la interacción entre la bacteria y la superficie desde cierta distancia (50nm).

Fase 3: Fijación. Después de la adhesión inicial, se establece un anclaje firme entre la bacteria y la superficie por medio de interacciones específicas (covalentes, iónicas o de unión de hidrógeno). Esto sigue un contacto directo o una unión de apéndices filamentosos extracelulares. Cada cepa de *Streptococcus* y *Actinomyces* une moléculas salivales específicas. Los *Streptococcus*, los principales colonizadores se unen a proteínas ácidas ricas en prolina y otros receptores en la película como la amilasa α y el ácido siálico. Las especies de *Actinomyces* pueden ser colonizadores primarios, *A. viscosus* posee franjas que contienen adhesinas que se unen específicamente a proteínas. Es evidente que algunas moléculas de la película someten a un cambio en su conformación en cuanto se absorben hacia la superficie dental para que los nuevos receptores estén disponibles.^{50, 68}

COLONIZACIÓN Y MADURACIÓN DE LA PLACA

La colonización primaria está dominada por cocos grampositivos anaerobios facultativos. Éstos se adsorben sobre las superficies cubiertas por la película poco tiempo después de la limpieza mecánica. La placa recolectada a las 24 horas está compuesta principalmente compuesta por *Streptococcus*, el más detectado es *S. sanguis*, también se hallan especies de *Actinomyces*. Después los cocos y bacilos facultativos grampositivos se congregan y multiplican, sus receptores de superficie permiten la adherencia posterior de microorganismos gramnegativos, que poseen poca capacidad de adherirse directamente a la película. La heterogeneidad aumenta a medida que la



placa envejece y madura. Como resultado de los cambios ecológicos se produce la colonización secundaria de más bacterias anaerobias gramnegativas estrictas que aumentan la patogenicidad de la biopelícula.⁴⁷ (Fig. 46)

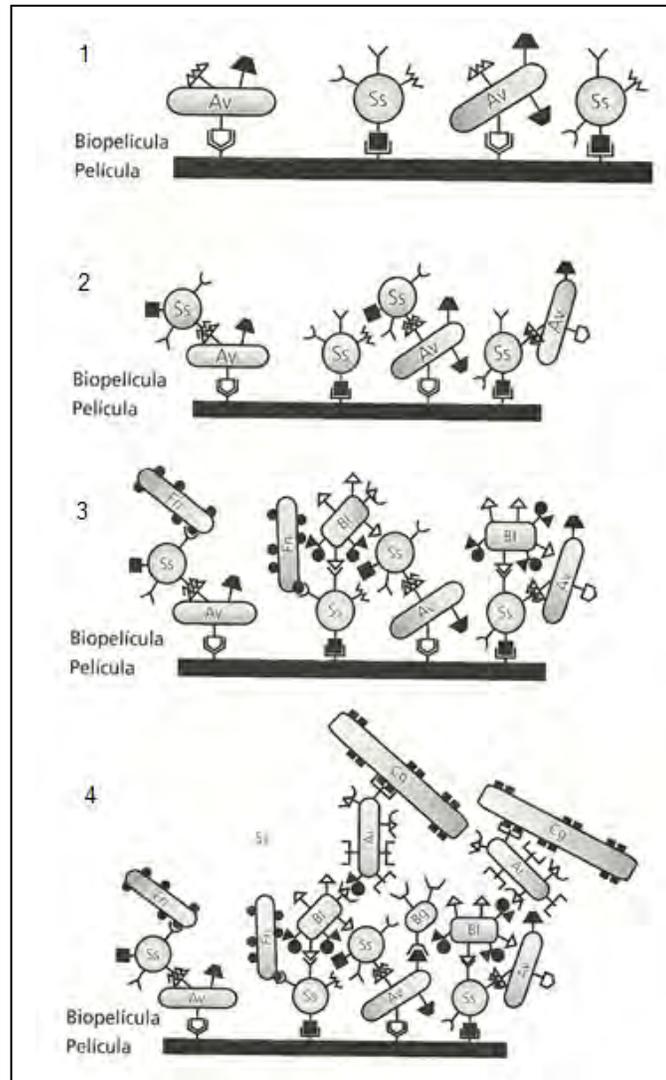


Fig. 46 Colonización primaria (1), cocos y bacilos se congregan (2), coagregación de microorganismos gramnegativos (3), la heterogeneidad aumenta a medida que la biopelícula madura (4).⁵⁰



Al menos 18 géneros bacterianos de la cavidad bucal han demostrado alguna forma de coagregación. En esencia todas las bacterias bucales poseen moléculas superficiales que fomentan algún tipo de interacción de célula a célula. Este proceso se da por medio de una interacción estereoquímica muy específica de moléculas de proteínas y carbohidratos localizadas en la superficie de las bacterias, además de interacciones menos específicas que son resultado de fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas y de van der Waals.

Las *fusobacterias* se coagregan con todas las demás bacterias bucales humanas, mientras que *veillonellas*, *capnocytophagos* y *prevotellas* se unen a *streptococcus* y *actinomicetos*. Cada célula recién agrandada por la agregación se vuelve una superficie naciente y, por tanto puede actuar como pilar de coagregación para el siguiente tipo celular.^{50, 68}

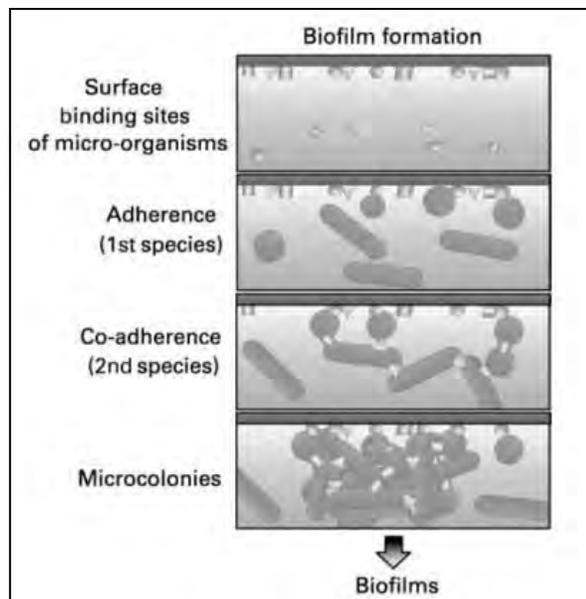


Fig. 47 Agregación y coagregación en el biofilm.⁶⁹



La mayor parte de las coagregaciones entre cepas de diferentes géneros están mediadas por adhesinas tipo lectina y pueden inhibirse con lactosa y otras galactosidas. Los colonizadores secundarios (*P. intermedia*, *P. loescheii*, *Capnocytophaga* spp, *F. nucleatum*, *Phorphyromonas gingivalis*) no colonizan al principio superficies dentales limpias sino que se adhieren a bacterias que ya se encuentran en la masa de la placa dental. En las etapas posteriores de formación de la placa, la coagregación probablemente predomine entre diferentes especies gramnegativas. Ejemplos de este tipo de interacciones son la coagregación de *F. nucleatum* con *P. gingivalis* o *Treponema denticola*.⁵⁰ (Fig. 48)

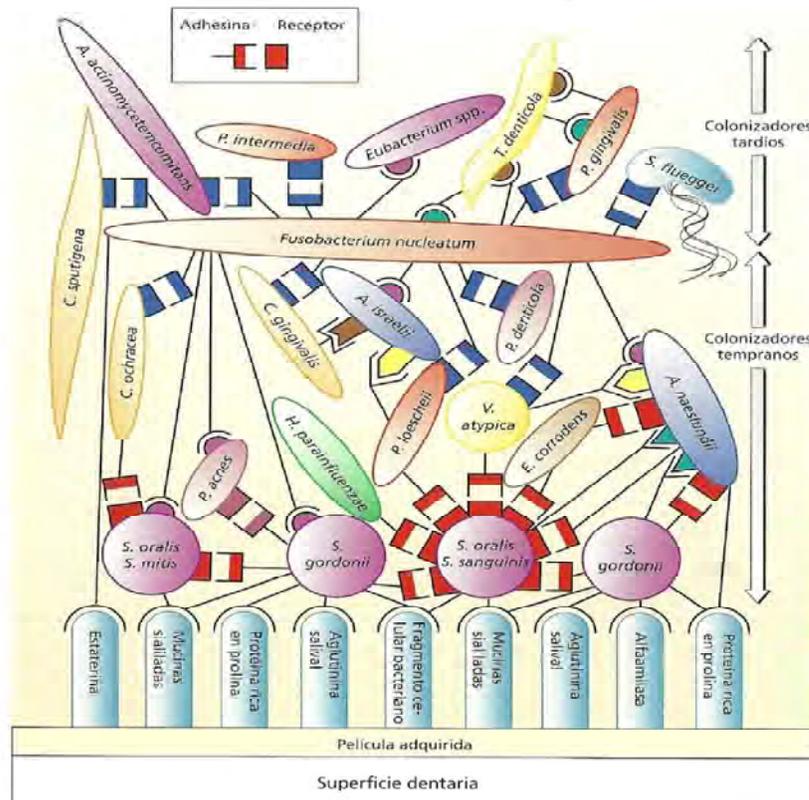


Fig. 48 La comunidad microbiana en la biopelícula dental.⁵⁰



DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE LA PLACA DENTAL

Se presentan cambios importantes en el índice de crecimiento de la placa durante las primeras 24 horas. En las primeras 2 a 8 horas, los *Streptococcus* adherentes saturan los sitios de unión salival de la película y por tanto, cubren de 3 a 30% de la superficie del esmalte. En lugar del crecimiento estable esperado durante las siguientes 20 horas se observa un período corto de crecimiento rápido. Después del primer día la organización se da dentro de la biopelícula. Los microorganismos, comprimidos forman un empalizado, mientras que otros empiezan a desarrollar un pleomorfismo.

El crecimiento posterior de la masa de la placa se da por la multiplicación de microorganismos ya adheridos más que por nuevos colonizadores. El grosor de la placa aumenta lentamente con el tiempo, de 20 a 30 μm después de 3 días.^{50, 68} (Fig. 49)

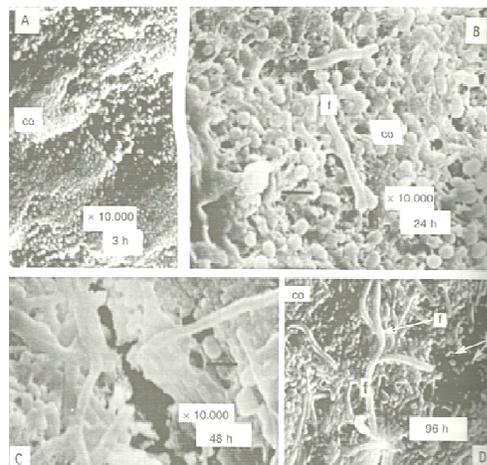


Fig. 49 Morfogénesis de la biopelícula de la placa dental. A tres horas. Película adquirida. B veinticuatro horas. Aumento de células cocoides inclusión de organismos filamentosos. C cuarenta y ocho horas. Aumento de organismos filamentosos. D noventa y seis horas.

Prevalencia de organismos filamentosos.⁵



4. MECANISMOS DE COMUNICACIÓN BACTERIANA

Las bacterias han sido consideradas usualmente como microorganismos carentes de una dimensión social. Se creía que sus actividades, completamente individuales salvo en algunas excepciones, se reducía a crecer, captar alimento, adaptarse a las condiciones del medio y reproducirse. Sin embargo actuales descubrimientos han cambiado radicalmente este concepto del mundo microbiano.

En la actualidad se sabe que las bacterias han desarrollado sofisticados sistemas de señales, lenguajes bacterianos, que les han permitido comunicarse entre sí. En la mayor parte de los casos el objetivo de las señales emitidas es detectar cuantas entidades del mismo grupo se encuentran cercanas, para iniciar así con acciones concertadas. Por medio de este lenguaje las bacterias son capaces también de transmitir a sus congéneres información sobre las condiciones físicas y químicas del ambiente y sobre la disponibilidad de elementos nutritivos.

De este modo las poblaciones bacterianas funcionan como un grupo disciplinado, actuando por sorpresa solo cuando se ha alcanzado un número mínimo o *quórum* para que éste sea efectivo. Por lo cual el mecanismo de comunicación intercelular se ha denominado detección del *quórum* (*quórum sensing*).⁷⁰

Este fenómeno fue descrito ya en los años 70, en bacterias marinas, que solo emiten luz cuando la población ha alcanzado una densidad celular suficiente como para que pueda ser detectada macroscópicamente, para ello emiten una señal cuya concentración crece de forma proporcional a la



población. (Fig. 50) La bacteria patógena *Pseudomona aeruginosa* utiliza este mismo mecanismo de comunicación para lanzar un ataque masivo y coordinado que pueda superar las defensas del huésped.

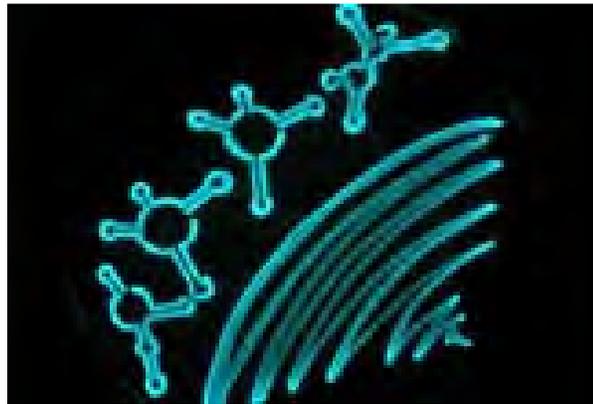


Fig. 50 Cultivo de bacterias marinas luminiscentes.⁷¹

Las bacterias utilizan señales químicas extracelulares para coordinarse en acciones como la producción de antibióticos, la transferencia de plásmidos, la síntesis de polisacáridos y exoenzimas relacionados con la virulencia de patógenos, la formación y maduración de biopelículas, la formación de estructuras especializadas y esporulación.

Existen diversos lenguajes que son utilizados por diferentes grupos bacterianos y utilizan señales químicas diferentes. En algunos casos dos lenguajes diferentes coexisten en la misma especie, uno de ellos específico y otro genérico, permitiendo así a las bacterias saber cuántos miembros de su misma especie se encuentran en las inmediaciones.⁷² (Fig. 51)

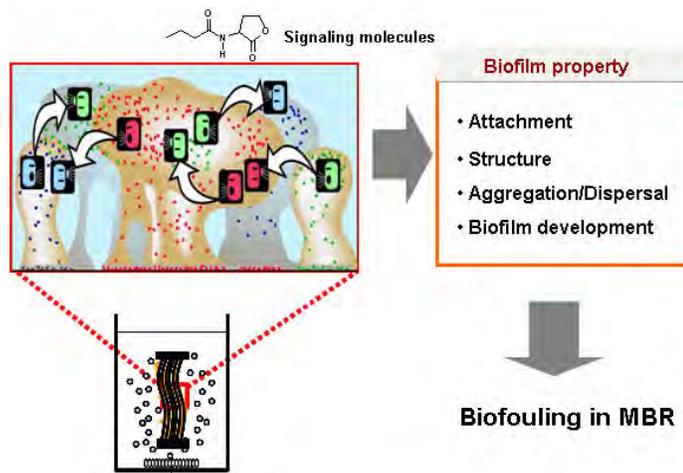


Fig. 51 Comunicación entre bacterias.⁷³

Debido a la inmensa importancia de las señales del *quórum* en numerosos procesos patógenos, otras bacterias y algunos eucariotas han desarrollado sistemas para inactivar estas señales, en un proceso denominado intercepción de *quórum*, *quórum quenching*, consiguiendo de esta forma evitar que se reciban las señales.

ANTECEDENTES

El proceso de *quórum sensing* fue observado por primera vez cuando, Kenneth H. Nealson y John Woodland Hastings (1970), notaron que la intensidad de la luz emitida por cultivos de bacterias luminosas no era constante. Se dieron cuenta de que el cultivo no emitía luz hasta que la población alcanzaba una elevada densidad y que ésta disminuía en cultivos envejecidos. Entonces averiguaron que la luz provenía de una serie de reacciones químicas catalizadas por una enzima llamada luciferasa, y postularon que dicha enzima debía estar controlada por algún mecanismo molecular cuya señal era producida por las mismas bacterias. Llamaron



autoinducción a este fenómeno y a la molécula que servía de señal, autoinductor.^{74, 75}

La bacteria marina *Vibrio fischeri*, aunque puede vivir libremente, se ha adaptado para habitar dentro de un órgano especializado del calamar *Euprymna scolopes* en una relación simbiótica.⁷⁶ En esta relación el hospedero provee nutrientes y la bacteria genera luz que sirve al calamar para atraer presas, alejar depredadores, entre otras actividades. Gracias a la disponibilidad de nutrientes proporcionados, las bacterias se multiplican hasta alcanzar una alta densidad, y en ese momento la población bacteriana comienza a producir luz. El mecanismo de señalización que controla la producción de luz de *V. fischeri* les sirve a estas bacterias para distinguir si se encuentran en vida libre o dentro del órgano de luz. (Fig. 52)



Fig. 52 *Euprymna scolopes*. Animal nocturno, usa su órgano luminoso durante la búsqueda de alimento, como sistema de camuflaje, proyectando la luz hacia abajo. El órgano luminoso está colonizado por un gran número de bacterias *V. fischeri*, de modo que la molécula autoinductora se acumula por encima de una cierta concentración y desencadena la producción de luz.⁷⁷



4.1 SEÑALES EN EL BIOFILM: *QUORUM SENSING*

Las bacterias han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten detectar y responder a las condiciones ambientales. El estudio de detección de estos cambios es denominado genéricamente mecanismo de transducción de señales (*signal transduction*), este sistema de comunicación permite a las bacterias transmitir información dentro de cada célula individual a través de cascadas de fosforilación desde una proteína sensora hasta las proteínas reguladoras.

Estos sistemas sensores permiten a la célula producir una respuesta adaptativa a cambios en el ambiente externo mediante la alteración de los patrones de expresión génica.

Actualmente se sabe que las bacterias también producen y responden a señales extracelulares producidas por otras bacterias. Estos mecanismos de comunicación intercelular permiten a las bacterias desarrollar comportamientos cooperativos. Dentro de los procesos que se pueden clasificar como cooperativos o de división del trabajo se ejemplifican en la siguiente tabla:



Tabla 2 Algunos ejemplos de especialización celular y comportamiento cooperativo en bacterias.⁷⁸

Actividad cooperativa en organismos superiores	Homología en el mundo microbiano
Creación de refugios	Biopelículas
Caza o ataque cooperativo	Mixobacterias Algunos patógenos (<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>)
Suministro de alimento	<i>Rhizobium</i> Heterocistes en Cianobacterias
Defensa	Células periféricas en Mixobacterias <i>E. Coli</i> productoras de colicina
Comunicación química cooperativa	Bioluminiscencia en <i>Vibrio fischeri</i>
Especialización para la dispersión	Crecimiento en ondas de mar "swarming" Cuerpos fructíferos de Mixobacterias
Autólisis	<i>E. coli</i> Mixobacterias

El descubrimiento de la existencia de mecanismos generalizados de comunicación intracelular que permite a las bacterias actuar de forma coordinada es denominado *Quorum sensing*, este término fue utilizado por



Fuqua, Winans y Greenberg en 1994 y ha sido difundido ampliamente para designar a un proceso denominado previamente autoinducción.

La detección de *quórum* implica la producción y liberación al medio de pequeñas moléculas señal, denominadas: autoinductores o feromonas, por parte de la célula bacteriana. La concentración de estas moléculas señal le sirve a la bacteria como mecanismo de detección de la densidad celular en el medio. A medida que la población crece, el nivel extracelular de esta molécula señal se incrementa, hasta que alcanza una concentración umbral que equivale a un censo mínimo o *quórum*, desencadenando la expresión de los fenotipos adecuados. Éstos pueden consistir en la activación o incluso en la represión de la expresión de genes, o incluso en la represión de ésta, mediante la acción de sistemas sensores reguladores.⁶⁷ (Fig. 53)

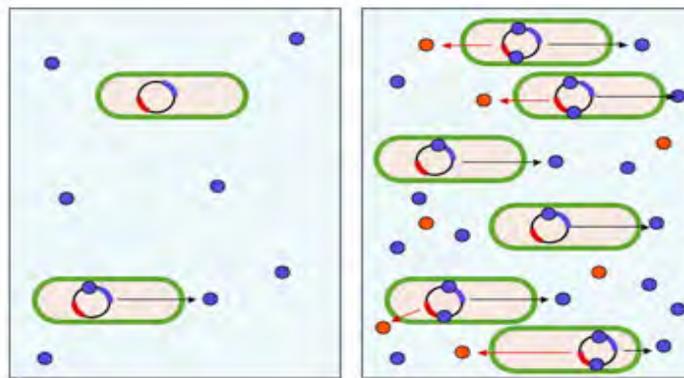


Fig. 53 Diagrama del *quorum sensing*. A la izquierda, la población de células y la concentración de la molécula autoinductora (puntos azules) son bajas, por lo que la sustancia (puntos rojos) no se produce. Esto sí sucede cuando la población ha aumentado y la concentración del autoinductor es alta (derecha de la imagen).⁷⁹

La detección de los niveles de su población, es esencial para el desarrollo de mecanismos cooperativos que permitan desarrollar las acciones adecuadas.



Actualmente se conoce que los sistemas de detección de *quórum* intervienen además en el control de funciones fisiológicas, tales como:

- Crecimiento en ondas de mar, o anillos, “swarming”.
- Bloqueo de la división celular
- Formación de endosporas
- Maduración de biopelículas
- Síntesis de exopolisacáridos capsulares
- Producción de exoenzimas y citotoxinas determinantes de virulencia en patógenos humanos y de plantas, entre otros.

Aunque en el caso de *V. fischeri* la activación de los genes dependientes de quórum implica la activación del generador de señal, que permite la rápida acumulación de ésta en un proceso que se llamó autoinducción, este término ha sido utilizado para cualquier proceso dependiente de densidad celular, independientemente de que exista o no retroalimentación positiva de la señal. De igual forma la utilización del término detección del quórum se ha difundido de forma errónea a cualquier tipo de señal intercelular no necesariamente dependiente de densidad. Aunque los procesos de comunicación intercelular más conocidos se basan en la detección de la densidad poblacional y por ello se ha utilizado el nombre de detección de quórum, este término no describe de forma correcta todos los fenómenos de intercambio de información bacteriana, que aunque puedan depender del número de bacterias presentes, controlan procesos que no se relacionan con la densidad de la población. Por lo anterior se hace una distinción entre *quormonas* para aquellas señales que se relacionan directamente con la densidad poblacional y *feromonas* para las que se relacionan con otros



procesos como el desarrollo y la detección de receptores para la conjugación.⁸⁰

Los genes activados por los sistemas de *quórum sensing* son de tres tipos:

- Procesos de acción en masa, en los que la acción de una sola bacteria no sería suficiente (procesos de virulencia).
- Preparación para la competición por nutrientes
- Procesos de desarrollo, como la producción de biopelículas

Las distintas bacterias utilizan más de una señal, incluso, más de un tipo de señal y han desarrollado complejos circuitos jerárquicos de regulación para integrar y procesar la información, de forma que las señales puedan ser utilizadas para diferenciar entre especies dentro de una microcolonia. Generalmente la expresión completa del regulador dependiente de quórum sensing se produce sólo cuando otros co-factores como la temperatura, presencia de factores dependientes del hospedador y los nutrientes del medio están presentes, integrando la información poblacional con otros sistemas de transducción de señales.

Las señales de comunicación intercelular (CCSM), que potencialmente pueden funcionar como moléculas detectoras de quórum, son moléculas pequeñas, que pueden encontrarse en el medio de cultivo agotado después del crecimiento. Estas moléculas se definen por ciertos criterios:

- Su producción debe realizarse durante fases de crecimiento específico, en ciertas condiciones físicas o en respuesta a cambios en el ambiente.



- Se deben acumular extracelularmente y ser reconocidas por un receptor específico.
- Su acumulación debe generar una respuesta concertada, una vez alcanzada la concentración umbral.
- La respuesta celular debe ser distinta de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar las señales de comunicación intercelular.

Existen tres tipos de señales de quórum:

- 1) Las bacterias gramnegativas producen generalmente N-acil-L-homoserín lactonas (AHLs) que poseen una gran diversidad de conformaciones, difiriendo en la cadena lateral. Son moléculas de bajo peso molecular, por su naturaleza lipídica pueden difundirse libremente a través de la membrana celular.^{81, 82} (Fig. 54)

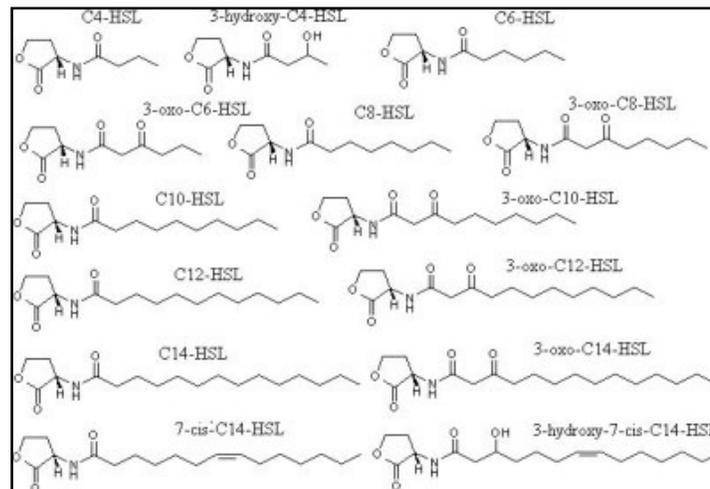


Fig. 54 Estructuras de AHLs.⁸³



- 2) En bacterias grampositivas la coordinación intercelular se realiza mediante la acción de pequeñas moléculas señal de naturaleza peptídica, denominados autoinductores peptídicos (AIPs). Las señales se exportan activamente al medio y en algunos casos se modifican y truncan para interactuar con los dominios externos de proteínas sensores de membrana.

Una vez que los precursores de los péptidos son sintetizados, estos son procesados y modificados para obtener el péptido maduro, el cual es exportado mediante un transportador de la familia ABC (ATP-Binding-Cassette).⁸⁴

La transducción de la señal se produce mediante una cascada de fosforilación que culmina en la activación de una proteína que modula la transcripción de los genes diana, controlando procesos como la secreción de factores de virulencia, esporulación y competencia. (Fig. 55)

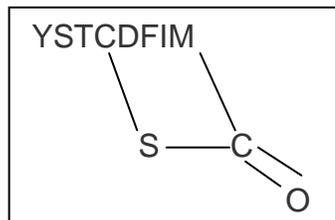


Fig. 55 Las bacterias grampositivas utilizan péptidos cortos, que en algunos casos presentan modificaciones. Esta estructura muestra uno de los autoinductores de *Staphylococcus aureus*.⁷⁰

- 3) Un tercer tipo de autoinductor es denominado AI-2, cuya estructura es un diéster furanosil borato y combina ambos tipos de comunicación. Mientras que las AHLs y los autoinductores peptídicos son muy específicos, el autoinductor AI-2 se encuentra tanto en bacterias



grampositivas como gramnegativas, lo que indica que puede actuar como lenguaje químico interespecífico.^{85, 86} (Fig. 56)

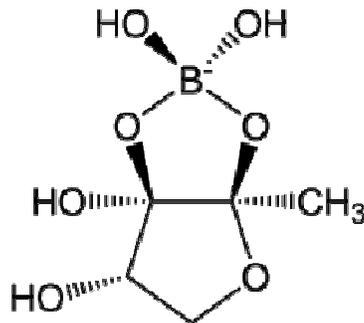


Fig. 56 El diéster furanosil burato o AI-2 es utilizado tanto por bacterias grampositivas como por gramnegativas.⁸⁷

Además del sistema universal AI-2, existen otros sistemas de quórum sensing, como las γ -butirolactonas que controlan la esporulación y producción de antibióticos en *Streptomyces* su estructura es similar entre las moléculas implicadas en *quórum sensing* en bacterias grampositivas y las AHLs de gramnegativas, ya que ambas están formadas por un anillo lactona polar y una cadena corta lateral derivado de un ácido graso, sin embargo el mecanismo por el que actúan es diferente.⁸⁸

Aparte de de estos tres tipos de inductores principales o señales de quórum se han descrito otros modelos de comunicación intercelular relacionados con la detección de la densidad poblacional.

En la siguiente tabla se mencionan algunas otras moléculas implicadas en la comunicación intercelular.



Tabla 3 Moléculas implicadas en la comunicación intercelular.⁷

Nombre y estructura	Organismo representativo	Función regulada
N-acilhomoserina lactona (AHL)	<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transferencia de plásmidos
	<i>Erwinia carotovora</i>	Virulencia y producción de antibióticos
	<i>Pseudomona aeuroginosa</i>	Virulencia y formación de biofilms
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Virulencia
Furanosilborato (AI-2)	<i>Vibrio harveyi</i>	Virulencia
Tiolactona cíclica (AIP-II)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virulencia
Éster metílico del ácido hidroxipalmítico (PAME)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Virulencia
Ácido metildodecenoico (DSF)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virulencia
Ácido farnesoico	<i>Candida albicans</i>	Transición dimórfica y virulencia

En muchos casos no funciona uno sólo de estos sistemas, sino que varios sistemas de detección funcionan simultáneamente controlando genes distintos o funcionando de forma sincronizada. Asimismo muchas especies patógenas y simbióticas transmiten señales químicas que inducen un cambio en el comportamiento de las células del hospedador.^{70, 85}



5. PROPIEDADES DEL BIOFILM

5.1 HETEROGENEIDAD FISIOLÓGICA

Los biofilms se componen de 97% de agua, el resto son células microbianas y productos derivados de éstas. Los biofilms son estructuras heterogéneas con tres patrones químicos, que corresponden a diferencias en gradientes de concentraciones desde el exterior al interior de la biopelícula.

El patrón de sustrato metabólico determina mayor concentración en el exterior y menor en el interior, el patrón de producto metabólico es inverso al anterior y el patrón de intermediarios metabólicos muestra mayor concentración entre la parte colindante de la biopelícula en la fase acuosa. Dichos patrones generan que dentro de estas estructuras se presenten diferencias de gradientes de pH y oxígeno, lo que permite que se establezcan poblaciones microbianas aerobias, anaerobias o facultativas dentro de los diferentes estratos de la biopelícula. La medición de oxígeno y de otros gases demostró que ciertas colonias son completamente anaerobias aún cuando estén compuestas por una sola especie y crezcan en aerobiosis.^{50, 67}

En consecuencia, las principales características de las biopelículas son: adherencia, heterogeneidad, diferentes microambientes (pH, oxígeno, concentración de iones, carbono, nitrógeno), sistema de canales de agua, resistencia a la defensa del hospedero, agentes microbianos y comunicación entre bacterias (*quórum sensing*).



Dentro de un biofilm puede observarse un rango muy amplio de micronichos, separados unos de otros por mínimas instancias ($10\mu\text{m}$). Pueden encontrarse ambientes diferentes en cuanto al contenido de nutrientes, tensión de oxígeno, tensión de dióxido de carbono, pH, por ello células de la misma especie pueden presentar estados fisiológicos diferentes.

Las células bacterianas de la biopelícula pueden producir enzimas como las betalactamasas contra los antibióticos, catalasas o superóxido dismutasas contra los iones oxidantes liberados por los fagocitos. Estas enzimas se liberan en la matriz y producen una línea de defensa. Las células bacterianas también pueden producir elastasas y celulasas que se concentran en la matriz local y producen daño tisular.⁵⁰

5.2 FENOTIPOS

Cuando las bacterias crecen en biofilm, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica. Los fenotipos de las bacterias que crecen en biofilms son más resistentes frente a diversos antimicrobianos, incluso mantienen cierta resistencia cuando se desprenden del biofilm.

5.3 CAPACIDAD ADAPTATIVA

Los biofilms deben mantener un equilibrio entre su crecimiento en condiciones favorables, en cuanto a aportes de nutrientes y el mantenimiento de su estructura.



En condiciones desfavorables, el biofilm puede evolucionar hacia estadios anteriores, pero generalmente se mantiene como parte del mismo y unido a la superficie, pudiendo volver a desarrollarse cuando las condiciones mejoren. La característica de las bacterias de tener mayor plasticidad para modificar su material genético tanto para cambios reales o su expresión ante circunstancias adversas le permite adaptarse al medio ambiente hostil.⁵



6. VENTAJAS DEL BIOFILM

Las bacterias se tornan más resistentes cuando crecen en una biopelícula, en comparación a las bacterias que se desarrollan en forma planctónica. De este modo las bacterias que viven en biofilm presentan una serie de ventajas:

- Protección frente a agresiones externas y mayor resistencia frente a distintos microbianos⁸⁹
- Aporte de nutrientes y eliminación de desechos
- Ambiente adecuado para el desarrollo bacteriano
- Capacidad de intercomunicación entre ellas.⁹⁰

6.1 RESISTENCIA FRENTE A ANTIMICROBIANOS

La importancia de las biopelículas en la medicina radica en que las infecciones normalmente no son eliminadas y producen episodios recurrentes, una de las principales razones de este hecho es que las bacterias en una biopelícula son más resistentes a los antibióticos. Este fenómeno se explica mediante diferentes mecanismos,⁶⁷ como:

- a) Restricción de la penetración del antibiótico. Los antibióticos se pueden difundir a través de la matriz de la biopelícula, para inactivar las células atrapadas; sin embargo, la matriz de exopolisacáridos se comporta como una barrera física para estas moléculas modificando su transporte al interior, retarda la difusión del antimicrobiano, de tal



modo la concentración de éste disminuye, lo que ocasiona resistencia hacia estos antimicrobianos, así como a moléculas de elevado peso molecular con propiedades citotóxicas como lizosimas. Por otra parte la carga negativa de los exopolisacáridos es efectiva en la protección celular contra antimicrobianos cargados positivamente como los aminoglucósidos, por restricción de la permeabilidad durante toda la unión.

- b) Neutralización de antibióticos por productos microbianos. La difusión retardada disminuye la entrada del antibiótico a la biopelícula, lo que permite la destrucción del antibiótico por enzimas como la β -lactamasa descrito en *Pseudomonas aeruginosa*.⁹¹

- c) Tasa metabólica de crecimiento diferenciado y cambio de fenotipo. Las células dentro de las biopelículas se encuentran bajo un gradiente de nutrientes que genera células metabólicamente activas con acceso a estos nutrientes en la periferia de la biopelícula. En cambio las bacterias que se encuentran en el interior de la biopelícula son células metabólicamente inactivas. Varios antibióticos son activos sobre las células en crecimiento, de modo que las bacterias en el interior son protegidas de la acción citotóxica de estas sustancias. La penicilina y ampicilina no actúan sobre células que no estén en crecimiento y su acción es proporcional a su actividad; por otra parte las cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas actúan sobre células en fase estacionaria, pero son más eficaces en células en división. La activación de respuestas de estrés provoca cambios en la



fisiología de las bacterias y la aparición de fenotipos específicos en las biopelículas que combaten los efectos en los antibióticos.⁸⁸

- d) Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia del biofilm es el gradiente químico que se establece dentro. El oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente la eficiencia de los antibióticos.⁹²

- e) Generación de células persistentes. Existen poblaciones bacterianas persistentes, es decir poblaciones que después de una exposición prolongada a antibióticos aún permanecen viables, pueden conferir o no resistencia a su descendencia una vez eliminada la presión selectiva. Se han estudiado varios genes que participan en la generación de estas células, entre ellos se han identificado tres locus hip (high – level – persistence): A, B y AB que controlan la frecuencia de este fenotipo. Todos los microorganismos hip producen células más persistentes.^{67, 88}



7. IMPORTANCIA DEL BIOFILM EN LA SALUD

Los biofilms son reservorios de microorganismos patógenos, que pueden estar presentes en el medio ambiente y en el cuerpo humano.⁶⁰ Presentan un gran impacto en la medicina, debido a que se asocian a una gran variedad de enfermedades. Aunado a esto los biofilms son tolerantes a agentes antimicrobianos en concentraciones de 10 a 1000 veces mayores que lo que se necesita para eliminar a una célula bacteriana en estado planctónico. Los biofilms son resistentes a la fagocitosis, lo que dificulta su erradicación del huésped. La estructura de la matriz exopolisacárida bacteriana permite que sean resistentes a los biocidas, debido a la composición de los exopolisacáridos, la baja tasa de crecimiento, la resistencia al estrés y la presencia de bombas multidrogas.⁶⁰

7.1 EN LA CAVIDAD ORAL

La cavidad oral provee un ambiente adecuado para el desarrollo de una gran variedad de especies bacterianas. Este acumulo bacteriano es el resultado de la interacción entre el medio oral y la flora bacteriana, denominándolo placa dentobacteriana; así como su localización, composición microbiana, metabolismo e incidencia patológica posibles en el diente, en el tejido pulpar o en el periodonto.

Esta biopelícula de placa dental ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries dental y enfermedades periodontales.⁹³



La patogenicidad del biofilm dental en la cavidad oral está aumentada por dos características del biofilm: la resistencia incrementada a los antibióticos y el impedimento de ser fagocitada por las células inflamatorias del hospedador.

CARIES DENTAL

La interacción simultánea de microorganismos en presencia de un sustrato logra afectar a los dientes (tríada de Keyes). Los principales microorganismos relacionados con la caries dental son aquellos que participan en:

- El desarrollo inicial de la enfermedad
- La progresión de las lesiones establecidas

Se ha demostrado que *S. mutans* está relacionado con la biopelícula de placa cariogénica y asociado con su comienzo; al mismo tiempo, en la saliva hay un aumento significativo de estos microorganismos antes de la formación de caries dental. *S. sobrinus* es la segunda especie de importancia.⁵ (Fig. 57)

Se incluyen también *Lactobacilos spp.*, *Actinomyces* y otros microorganismos en la progresión de las lesiones establecidas, ya que son capaces de sobrevivir y proliferar en medios ácidos.

A partir del contacto con nutrientes exógenos (sacarosa) estos microorganismos se relacionan con la película adquirida que cubre los dientes a través de una matriz de polisacáridos extracelulares y conforman un sistema denominado biopelícula de la placa dental en el que se desarrollan y generan ácidos como producto del metabolismo de los carbohidratos. Si la disponibilidad de sacarosa es baja el pH del medio tiende



a ser alcalino y favorece el proceso de remineralización; en cambio, ante un exceso de sacarosa el pH se torna ácido y se acelera el proceso de desmineralización del esmalte.^{5, 8}

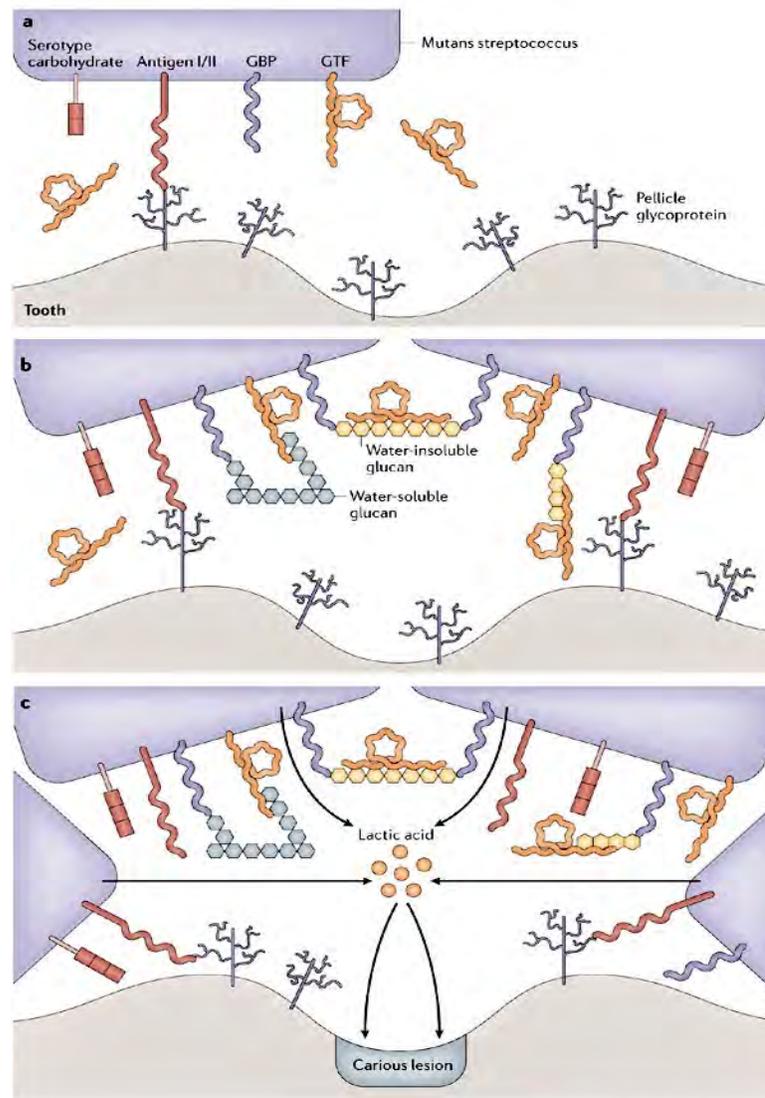


Fig. 57 *Streptococcus mutans* participa en la formación de biofilms sobre la superficie del diente, este biofilm es conocido como placa dental. Esta imagen ilustra la patogénesis de la caries dental asociada con *Streptococcus mutans*.⁹⁴



De acuerdo al tiempo transcurrido, las bacterias del medio bucal se incorporan a la biopelícula, se agregan entre sí, se multiplican y se organizan hasta conformar una biopelícula madura.

ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es compleja y multifactorial, esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias en el tejido conectivo gingival. La periodontitis es un proceso inflamatorio destructivo que afecta los tejidos de soporte del diente, la resorción del hueso alveolar, la formación de bolsas periodontales y eventualmente la pérdida del diente.⁹⁵ (Fig. 58)

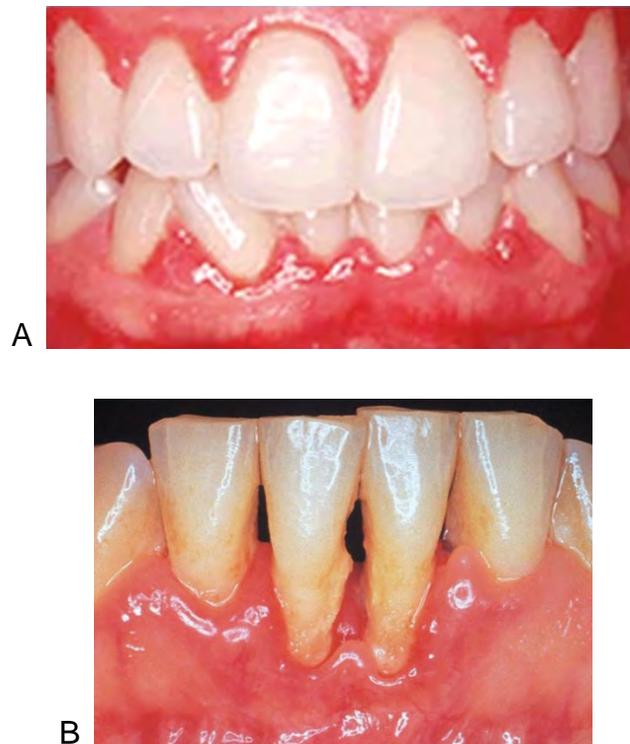


Fig. 58 A Esta imagen muestra cambios en el color y el contorno de la encía asociados a gingivitis inducida por placa bacteriana. B La periodontitis causa retracción del margen gingival, pérdida de hueso alveolar, movilidad dental y finalmente la pérdida del diente.^{96, 97}



Se considera que numerosas bacterias están asociadas con las enfermedades periodontales y varias de ellas son oportunistas, además ocupan un nicho ecológico posiblemente en respuesta a cambios producidos en el microambiente periodontal.⁹⁸ Dentro de las especies patógenas asociadas frecuentemente con la enfermedad periodontal se encuentran: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema vicentii* y probablemente *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*.^{5, 50} (Fig. 59)

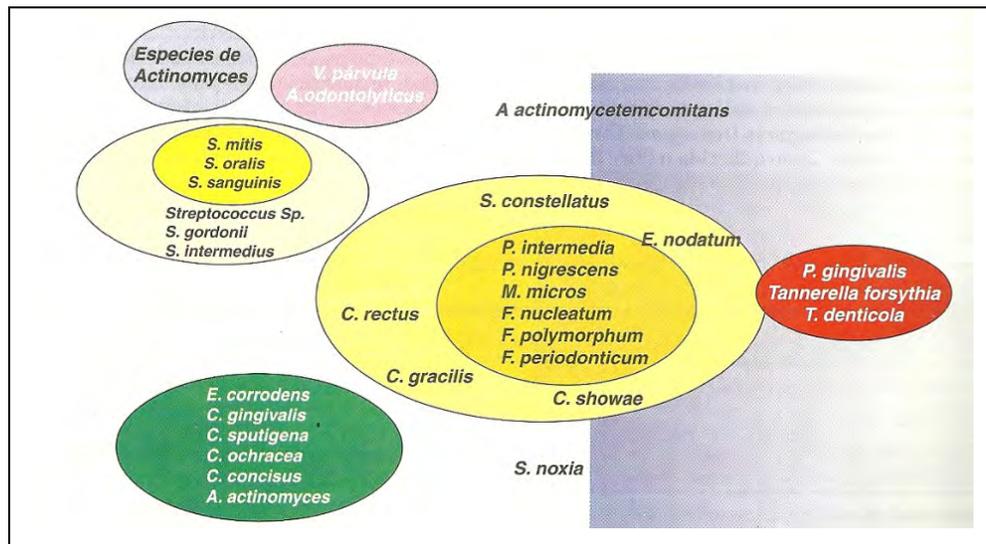


Fig. 59 Complejos microbianos.⁵

Aggregatibacter actinomycetemcomitans elabora leucotoxinas, bacteriocinas, factor inhibidor de la quimiotaxis, factor inmunosupresor, factor citotóxico, proteínas unidas a los receptores Fc, collagenasa, lipopolisacáridos.

Porphyromonas gingivalis produce un gran número de factores de virulencia, proteínas y productos terminales de su metabolismo que son activas frente a



un amplio espectro de proteínas del huésped, posee un mecanismo de evasión de las defensas del hospedador, favoreciendo de esta manera la progresión de la enfermedad.^{5, 8}

Varios microorganismos poseen factores de virulencia relacionados con la destrucción periodontal; sin embargo es probable que las respuestas inflamatorias del hospedador desempeñen un papel fundamental en la defensa y como mediadoras de la destrucción observada.

La mayoría de estas bacterias residen en la bolsa periodontal y no invaden tejidos periodontales, el sistema inmune no logra eliminar eficientemente a todos los microorganismos y esto ocasiona la inflamación crónica y una respuesta continua y excesiva del huésped llevando a la destrucción tisular debido al reclutamiento de leucocitos y la subsecuente liberación de mediadores y citocinas, factores de gran importancia en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

Aunque la presencia de patógenos periodontales es un requisito, la progresión de la enfermedad periodontal es dependiente de la respuesta del huésped hacia la bacteria patógena que coloniza la superficie del diente. La persistencia de la respuesta inmune debido a la tenacidad de estos patógenos rompe los mecanismos homeostáticos y causa la liberación de mediadores como las citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α), proteasas (metaloproteinasas), prostanoïdes (prostaglandina E₂) las cuales promueven a la matriz extracelular de la encía y estimulan la resorción ósea.⁹⁵

Las enfermedades infecciosas periodontales se asocian con el crecimiento de ciertas especies de bacterias gramnegativas facultativas, estas bacterias



tienen muchos factores de virulencia, sin embargo, la infección no se asocia con la pérdida de hueso.

7.2 CONTROL DEL BIOFILM

La placa dental es una biopelícula bacteriana que no se elimina con facilidad de la superficie de los dientes. Estas comunidades complejas de especies bacterianas residen sobre las superficies dentarias o los tejidos blandos. Se sabe que los productos bacterianos de la biopelícula inician una serie de reacciones que conducen a la protección del huésped, pero también a la destrucción de tejidos.

El entendimiento de los fenotipos predominantes asociados al biofilm dental ha hecho necesario un cambio en el paradigma de los tratamientos. Este cambio incorpora la hipótesis de la placa ecológica, que postula que la prevención de la enfermedad no solo debería estar enfocada a la inhibición de los patógenos causantes, sino también a la interferencia de los factores ambientales que dirigen la selección y enriquecimiento de dichas bacterias.⁹⁹

Las características claves del biofilm que podrían ser objetivo para el manejo de los patógenos incluyen: su comportamiento como una congregación que tiene la capacidad de adherirse a una superficie, su actividad como una comunidad de varias especies coordinadas, en las cuales las células se comunican por intercambio de pequeñas moléculas, y su potencial de generar enfermedades inflamatorias.

La biopelícula dental es una configuración compleja, y está de cierta forma expuesta a la saliva y a mecanismos de auto limpieza en la cavidad oral. Sin



embargo para mantener el control de crecimiento de la biopelícula dental es preciso adoptar medidas en forma regular, para poder desorganizar su estructura.⁵⁰ Dentro de estas medidas se encuentran:

- La limpieza mecánica, que consiste en cepillado meticuloso y regular de los dientes, así como el uso del hilo dental para la eliminación de la placa interdental y demás accesorios.
- Uso de enjuagues bucales que pueden interferir en la adhesión y la maduración de la biopelícula dental.

El autocontrol minucioso de la placa dental puede modificar tanto la cantidad como la composición de la placa dental. Del mismo modo la eliminación eficaz de biopelícula dental es esencial para la salud dental.

Durante el cepillado la desorganización de la placa bacteriana se alcanza principalmente mediante el contacto directo entre los filamentos del cepillo dental y las superficies de los dientes y los tejidos blandos. Para ello es necesario utilizar un cepillo y una técnica de cepillado adecuados. (Fig. 60)



Fig. 60 Cepillado dental.¹⁰⁰



En el control químico de la placa dentobacteriana se utilizan compuestos químicos (enjuagues bucales) para complementar el cepillado, estos compuestos pueden actuar directamente sobre las bacterias de la placa dental o alterar diversos componentes de ésta para permitir un retiro más fácil y más completo.

La clorhexidina es uno de los agentes más eficaces para combatir la placa dentobacteriana, éste compuesto puede fijarse a la mucosa oral debido a su fuerte carga positiva y liberarse poco a poco en el transcurso de 8 a 12 hrs; esta propiedad se conoce como sustantividad. Este antiséptico se une a la membrana plasmática bacteriana y en concentraciones bajas esto da como resultado un aumento de la permeabilidad, con pérdida de componentes intracelulares, incluido el potasio. En altas concentraciones causa precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular. La clorhexidina no tiene toxicidad sistémica en su uso bucal y no produce resistencia bacteriana ni sobreinfección.^{50, 101}



CONCLUSIONES

Los microorganismos pueden vivir en forma planctónica independiente, pero también pueden tener un ciclo de vida interdependiente en el cual funcionan como una parte integral de un sistema biológico con un alto nivel de organización formando estructuras coordinadas y comunidades funcionales.

Estas comunidades tienen un papel muy importante en la infección y entender el comportamiento del Biofilm permitiría un mejor manejo de las alteraciones que puede causar, así como la implementación de medidas que conduzcan a su prevención.

La excepcional resistencia de las bacterias surge, en parte, de la heterogeneidad que existe en el interior de la biopelícula.

Las bacterias lejos de ser seres solitarios, tienen la capacidad de organizarse en grupos y comunicarse, de esta forma intercambian información unas con otras, sobre las condiciones físicas y químicas del ambiente.

El proceso de comunicación intercelular que se produce con elevadas concentraciones celulares con el objetivo de iniciar acciones cooperativas, *quórum sensing*, se caracteriza por el intercambio de señales químicas.

Estas señales químicas producidas por una comunidad de microorganismos permite la asociación con otras bacterias para su beneficio. Este hecho puede resultar en procesos de generación de infecciones, que dificultan su eliminación como en el caso de la periodontitis.

La capacidad de comunicación bacteriana proporciona ventajas en diferentes aspectos, como ventajas metabólicas, mayor obtención de nutrientes,



resistencia a antibióticos y en general una mejor organización para realizar un proceso determinado.

Por esta razón el conocimiento de estos mediadores permitirá el manejo de estas señales y en consecuencia, dirigir estos procesos para evitar la contaminación bacteriana en nuestro beneficio.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. ***Bacterial biofilms in nature and disease***. Ann. Rev. Microbiol. 1987; 41: 435 – 464.
2. Costerton, J. W., and Lappin – Scott H. M. ***Microbial Biofilms***. H. M. Lappin – Scott and J. W. Costerton (ed.), Cambridge University Press, 1995. Pp. 1 – 11
3. Rodney M. Donlan, Ph.D. ***Staphylococcus aureus biofilm***. Disponible en: [http://commons.wikimedia.org/wiki/file: staphylococcus_aureus_biofilm_01.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/file:staphylococcus_aureus_biofilm_01.jpg) Consultado: Octubre 2010
4. <http://www.monografias.com/trabajos39/bacterias/bacterias.shtml> Consultado: Octubre 2010
5. Negroni M. ***Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica***. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana, 2003. Pp. 17 – 28, 45 - 62
6. <http://gramnegativa.blogspot.com/2010/01/por-una-vida-gram-negativa.html> Consultado: Octubre 2010
7. Willey, J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. ***Microbiología de Prescott, Harley y Klein***. 7ª ed. Editorial Mc Graw – Hill Interamericana, 2009. Pp. 39 – 78, 119 - 148
8. Liébana Ureña J. ***Microbiología Oral***. 2ª ed. España. Editorial Mc Graw – Hill Interamericana, 2002. Pp. 25 – 60, 515 - 525



9. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. **Microbiología Médica**. 5ª ed. Editorial Elsevier Mosby, 2006. Pp. 11 – 24
10. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/193/Articulos/Endotoxinas/Membranaexterna.htm> Consultado: Octubre 2010
11. Estrela C. **Ciencia Endodóntica**. 1ª ed. Brasil. Editorial Artes Médicas, 2005. Pp. 149 – 172
12. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sucrose_specific_porin_1A0S.png Consultado: Octubre 2010
13. <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter4.htm> Consultado: Octubre 2010
14. Gutiérrez G. **Lipopolisacáridos: Estructura, Receptores y Transducción de Señales**. Simposium de Transducción de Señales. UNAM, Facultad de Odontología. Julio 2002. Pp. 31 – 39
15. Bermúdez V., Leal E., Bermúdez F., Cano C., Cabrera M., Ambard M., Fagúndez A., Toledo A., Leal N., Lemus M. **Enfermedad Periodontal como Factor de Riesgo para Aterosclerosis**. AVFT. Julio 2003; 22(2) Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s0798-02642003000200008&script=sci_arttext Consultado: Octubre 2010
16. Stanier R. Y., Ingraham J. L., Whelis M. L., Painter P.R. **Microbiología**. 2ª ed. Editorial Reverté, 1992. Pp. 52 - 59
17. Sánchez J. T., Tay J. **Fundamentos de Microbiología y Parasitología Médicas**. Mendez Editores, 2003. Pp. 165 - 170



18. Watson J. D., Crick F. H. C., ***The structure of DNA***. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1953; 18: 123 – 131.
19. <http://interactivebiologythebigboss.blogspot.com/2009/03/estructura-del-dna.html> Consultado: Octubre 2010
20. <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2008/06/las-bacterias-y-la-paradoja-de-einstein.html> Consultado: Octubre 2010
21. Wheelis M. ***Principles of Modern Microbiology***. University of California. Jones and Bartlett Publishers, 2008. Pp. 74 – 79
22. <http://www.detusalud.com/la-resistencia-a-los-antibioticos-al-descubierto.html> Consultado: Octubre 2010
23. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/137315> Consultado: Octubre 2010
24. Kearns D. B. ***A Field Guide to Bacterial Swarming Motility***. Nature Rev. Microbiol. Septiembre 2010; 8: 634 - 644
25. Mims C., Playfair J. H. L., Roitt I. ***Microbiología Médica***. 2^a ed. Editorial Harcourt, 1999. Pp. 25 – 28
26. Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. ***Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg***. 18^a ed. Editorial Manual Moderno, 2005. Pp. 32 – 35
27. <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/coli-2.jpg> Consultado: Octubre 2010



28. Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K. – J. ***El Mecanismo de Adherencia en las Bacterias.*** Investigación y Ciencia, Marzo 1978; 18: 66 – 77.
29. Fleming H. and Wingender J. ***The Biofilm Matrix.*** Nature Rev. Microbiol. Septiembre 2010; 8: 623 - 633
30. <http://www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/NormalFlora.html> Consultado: Octubre 2010
31. Wilson M. ***Microbial Inhabitans of Humans. Their ecology and role health and disease.*** Cambridge university press, 2005. Pp. 319 – 373
32. Paster B. J., Olsen I., Aas J. A., Dewhirst F. E. ***The Breadth of Bacterial Diversity in the Human Periodontal Pocket and other Oral sites.*** Periodontol. 2000. 2006; 42: 80 – 87
33. Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E. ***Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral cavity.*** J. Clinic. Microbiol. Noviembre 2005; 43(11): 5721 – 5732
34. Zijng V., Vaan Leeuwen M. B., Degener J. E., Abbas F., Thurnheer T., Gmur R., Harmsen J. M. ***Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth.*** Febrero 2010; 5(2) Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2827546/?tool=pubmed> Consultado: Octubre 2010
35. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lapin – Scott H. M. ***Microbial Biofilms.*** Ann. Rev. Microbiol. 1995; 49: 711 - 745



36. Davey M. E., O Toole G. A. ***Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics***. Microbiol. Mol. Boil. Rev. 2000; 64: 847 – 867
37. Stoodley P., Sauer K., Davis D. G., Costerton J. W. ***Biofilms as Complex Differentiated Communities***. Ann. Rev. Microbiol. 2002; 56: 187 - 209
38. Stoodley P., DeBeer D. and Lappin – Scott H. M. ***Influence of Electric Fields and pH on Biofilm Structure as Related to the Bioelectric Effect***. Anti. Agen. Chem. 1997; 41: 1876 – 1879.
39. Bowden G. H. W., Hamilton I. R. ***Survival of Oral Bacteria***. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1998; 9(1): 54 – 85
40. Biswas S. K., and Chaffin W. L. ***Anaerobic Growth of Candida albicans does not support Biofilm Formation under Similar Conditions used for Aerobic Biofilm***. Cur. Microbiol. 2005; 51: 100 – 104
41. Pumarola A., Rodríguez – Torres A., García – Rodríguez J. A., Piedróna – Ángulo G. ***Microbiología y Parasitología Médica***. 2 ed. Ediciones Científicas y Técnicas, 1994. Pp. 69 – 76
42. <http://tapeda.blogs.uv.es/2008/12/21/efecto-de-la-temperatura-sobre-el-crecimiento-microbiano/> Consultado: Octubre 2010
43. Costerton J. W., Stewart P. S. ***Películas Bacterianas***. Investigación y Ciencia. Septiembre 2001; 300: 55 – 61
44. <http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/cdc/staph/sem3.html> Consultado: Octubre 2010.



45. Harrison J. J., Turner R. J., Marquez L. R., Ceri H. **Biopelículas.** Investigación y Ciencia. Marzo 2006; 354: 76 – 83
46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch39>
Consultado: Octubre 2010
47. O'Toole G. A., Kaplan H. B., Kolter R. **Biofilm Formation as Microbial Development.** Ann. Rev. Microbiol. 2000; 54: 49 - 79
48. <http://wvlc.uwaterloo.ca/biology447/Biofilms/biofilmsoverview.htm>
Consultado: Octubre 2010
49. <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2008/05/biofilms-ni-contigo-ni-sin-ti.html> Consultado: Octubre 2010
50. Lindhe J., Lang N. P., Karring T. **Periodontología Clínica e Implantología Odontológica.** 5ª ed. Editorial Médica Panamericana; 2009.
51. http://www.nature.com/nbtjournal/v23/n11/fig_tab/ntb1105-1378_F1.html Consultado: Octubre 2010
52. Donlan M. R. **Bofilm: Microbial Life on Surfaces.** Emer. Infect. Dis. 2002; 8: 881 - 890
53. http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora_2.html Consultado: Octubre 2010
54. Kolenbrander P. E. **Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions and Genetic System.** Ann. Rev. Microbiol. 2002; 54: 413 – 437



55. Kolenbrander P. E., Andersen R. N., Blehert D. S., England P. G., Foster J. S. and Palmer R. J. Jr. **Communication Among Oral Bacteria**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002; 66: 486 – 505
56. Branda S. S., Vik A., Friedman L., and Kolter R. **Biofilms: The Matrix Revisited**. Trends in Microbiol. 2005; 13: 20 – 26
57. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.php> Consultado: Octubre 2010
58. http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/EM_Staph_biofilm.html Consultado: Octubre 2010
59. Nazar C. J. **Biofilms Bacterianos**. Rev. Otorrinonaringol. Cir. Cabeza Cuello. Abril 2007; 67: 61 – 72
60. Fux C. A., Costerton J. W., Stewart P. S. and Stoodley P. **Survival Strategies of Infectious Biofilm**. Trends in Microbiol. 2005; 13: 34 - 40
61. Costerton J. W., Stewart P. S. and Greenberg E. P. **Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections**. 1999; 284: 1318 – 1322
62. <http://diseaseoftheweek.wordpress.com/2010/07/17/p-aeruginosa-biofilm-and-honey/> Consultado: Octubre 2010
63. Hall – Stoodley L. and Stoodley P. **Biofilm Formation and Dispersal and the Transmission of Human Pathogens**. Trends in Microbiol. 2005; 13: 7 – 10



64. Parsek M. R. and Greenberg. ***Sociomicrobiology: The Connections between Quorum Sensing and Biofilm.*** Trends in Microbiol. 2005; 13: 27 – 32
65. Hall – Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. ***Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases.*** Rev. Nature Microbiol. Febrero 2004; 2: 95 – 108
66. Lee S. F., Li Y. H. and Bowden G. H. ***Detachment of Streptococcus mutans biofilm cell by and endogenous enzymatic activity.*** Infect. Human. 1996; 54: 1035 – 1038
67. Castrillón L. E., Palma A., Padilla M. C. ***Importancia de las Biopelículas en la Práctica Médica.*** Dermatol. Rev. Mex. Enero – Febrero 2010; 54(1): 14 – 24
68. Carranza F. A., Newman M. G., Takei H. H., Klokkevold P. R. ***Periodontología Clínica.*** 10ª ed. Editorial Mc Graw – Hill Interamericana, 2010.
69. <http://www.autismpedia.org/wiki/index.php?title=Protocols/Usman>
Consultado: Octubre 2010
70. Otero A. M., Muñoz A., Bernárdez M. I., Fábregas J. ***Quorum Sensing: El Lenguaje de las Bacterias.*** Editorial Acribia. Zaragoza, España, 2004.
71. <http://www.livescience.com/health/bacteria-communication-bts-100618.html> Consultado: Octubre 2010



72. Keller L. and Surette G. M. ***Communication in Bacteria: an Ecological and Evolutionary Perspective***. Nat. Rev. Microbiol. Abril 2006; 4: 249 – 258
73. <http://wemt.snu.ac.kr/Research%20area/Quorum%20Sensing.htm>
74. Martínez A. A. y Soberón – Chávez G. ***El Complejo Lenguaje de las Bacterias***. Rev. Acad. Mex. Cien. Enero – Marzo 2002; 53(1): 60 – 67
75. Nyholm S. V. and Mc Fall-Ngai M. ***The Winnowing: Establishing the Squid-Vibrio Symbiosis***. Microbiol. Agosto 2004; 2:632 – 642
76. Losick R. y Kaiser D. ***Razón y Mecanismo de la Comunicación Bacteriana***. Rev. Investigación y Ciencia. Abril 1997; 247: 6 – 12
77. <http://blogs.discovermagazine.com/notrocketscience/tag/vibrio-fischeri/>
Consultado: Octubre 2010
78. Crespi B. J. ***The Evolution of Social Behavior in Microorganisms***. Trends in Ecol. Evol. 2001; 16: 178 - 183
79. <http://carabuxa.wordpress.com/2008/04/27/quorum-sensing/>
Consultado: Octubre 2010
80. Zhang L. H. ***Quorum Quenching and Proactive Host Defense***. Trends in Plant Sci. 2003; 8: 238 – 244
81. Feliú A., Delgado B., Cabal C., Cano J. ***La Comunicación entre Bacterias. Quórum Sensing***. Disponible en: bioloweb.



Comli.com/apuntes_txt/micro/seminario_Quorum_sensing.pdf/microbiología.org.mx/microbiosenlínea Consultado: Octubre 2010

82. Molloy S. **Quórum Sensing: Setting the threshold.** Rev. Nature Microbiol. Junio 2010; 8: 388 – 389
83. <http://www.pharmainfo.net/reviews/quorum-sensing-communication-between-bacteria/> Consultado: Octubre 2010
84. Colón – González M. T., Membrillo – Hernández J. **Comunicación entre Bacterias.** Disponible en: www.scribd.com/doc/29387958/comunicacion-entre-bacterias#open_download Consultado: Octubre 2010
85. Miller M. B., Bassler B. L. **Quorum Sensing in Bacteria.** Ann. Rev. Microbiol. 2001; 55: 165 – 169
86. Federle M. J., Bassler B. L. **Interspecies Communication in Bacteria.** J. Clin. Invest. 2003; 112: 1291 - 1299
87. <http://en.wikipedia.org/wiki/Autoinducer-2> Consultado: Octubre 2010
88. Williams P. **Quórum Sensing, Communication and Cross-kingdom Signalling in the Bacterial World.** Microbiol. 2007; 153: 3923 – 3938
89. Corona – Izquierdo F. P., Membrillo – Hernández J. **A Mutation in rpoS Enhances Biofilm Formation in Escherichia coli during Exponential Phase of Growth.** FEMS Microbiol. Letters 2002; 211: 105 – 110



90. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. ***Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.*** Sci. Mayo 1999; 284: 1318 – 1322
91. Nicolaou K. C., Boddy C. ***Desarrollo de Resistencia contra los Antibióticos.*** Investigación y Ciencia. Julio 2001; 298: 6 – 12
92. Herrera M. T. ***El papel del Biofilm en el Proceso Infeccioso y la Resistencia.*** Nova Public. Científica. Enro – Diciembre 2004; 2(2): 71 – 80
93. Xuesong H., Xuedong Z., Shi W. ***Oral Microbiology: Past, Present and Future.*** Int. J. Oral. Sci. Junio 2009; 1(2): 47 – 58
94. Taubman M. A., Nash D. A. ***The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries.*** Rev. Nature Immunol. Julio 2006; 6: 555 - 563
95. Castrillón L. E., Macín S. A., Palma A. ***Participación de la Interleucina 1 β (IL-1 β) en Periodontitis.*** Rev. Odontolog. Mex. Diciembre 2007; 11(4): 185 – 200
96. <http://www.rehabilitacionoralyestetica.com/periodoncia.htm>
Consultado: Octubre 2010
97. <http://www.colgateprofesional.com.uy/pacientes/Etapa-avanzada-de-Periodontitis/imagen> Consultado: Octubre 2010



98. Shao H. J., Demuth D. R. ***Quorum Sensing Regulation of Biofilm Growth and Gene Expression by Oral Bacteria and Periodontal Pathogens.*** Periodontol. 2000. 2010; 52(1): 53 – 67
99. Marsh P. D. ***Dental Plaque. Biological Significance of a Biofilm and Community Life-style.*** J. Clinic. Periodontol. Agosto 2005; 32(6): 7 – 15
100. <http://primicias24.com/salud/la-higiene-dental-puede-prevenir-infartos/>
Consultado: Octubre 2010
101. Higashida B. ***Odontología Preventiva.*** 1^a ed. Editorial Mc Graw – Hill Interamericana. 2000