



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BIOFILM BUCAL

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

MACARIO CIELO MALDONADO

DIRECTORA C.D. LAURA MARGARITA MÉNDEZ GUTIÉRREZ
ASESOR C.D. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA
ASESOR C.D. FELICITAS GABRIELA FUENTES MORA

MÉXICO D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Todo mi agradecimiento,
por darme la oportunidad de conocer su grandeza.

A la Facultad de Odontología por mi formación académica

POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU

Gracias a Dios:

Por permitirme existir.

Gracias a mis Padres:

Por darme la vida.

Gracias Gaby:

Por tu infinito amor, apoyo y paciencia, por confiar en mi y creer que puedo lograr lo imposible, por ser mi apoyo, pero sobre todo por no perder la fe, pero ante todo por todo el infinito amor que existe en ti, por que siempre es posible luchar por lo que amamos y porque siempre hay tiempo de empezar de nuevo. Te amo.

Gracias Carlos:

Por que de ti aprendí, que lo más importante de la vida, es la vida misma y que no importa cuantas veces te caigas, en el camino sino cuantas veces te levantas y sigues adelante siempre has sido y serás mi motivo para seguir. Te amo hijo.

Gracias a Jesús y Paty: Para mi son ustedes muy importantes.:

Agradezco su ayuda incondicional su cariño y apoyo para la realización de este gran sueño, por esos pequeños y grandes consejos que me han permitido ver que siempre contaré con ustedes y que ustedes siempre podrán contar conmigo, los quiero gracias.

Gracias a la Dra. Luz del Carmen González García:

Por enseñarme que de los errores también se puede aprender, pero sobre todo, por brindarme su amistad, apoyo y por la gran paciencia en este último tramo del camino. ¡Gracias por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo!

Gracias a la Dra. Laura Margarita Méndez Gutiérrez:

Por su comprensión y amistad su infinito apoyo para poder llegar a buen termino en esta última parte de mi formación académica por su dedicación, su amistad. ¡ Gracias Dra.!

Gracias:

Muy en especial a Rosita Cruz por todo lo que me has ayudado en el transcurso de mi formación académica pero sobre todo gracias por tu amistad. ¡Eres una gran persona!

Gracias:

A Lilia, Gloria, Claudia. Y a cada uno de ustedes mi familia por su apoyo y gran ayuda en muchos momentos gracias los quiero.

Y finalmente gracias a cada uno de ustedes que formo parte de este gran proyecto que me permitió realizarme como ser humano y como profesionista

Gracias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN DEL BIOFILM BUCAL

- 1.1. Estructura bacteriana
- 1.2. Sistema ecológico de la cavidad bucal
- 1.3. Adherencia microbiana
- 1.4. Película adquirida

2. INTERRELACIONES NUTRICIONALES ENTRE LAS BACTERIAS Y EL HUÉSPED

- 2.1. Oxígeno y productos oxigenados como determinantes ecológicos
- 2.2. Potencial de óxido-reducción
- 2.3. Concentración de iones de hidrógeno.
- 2.4. Importancia del potencial óxido-reducción
- 2.5. Factores nutricionales
- 2.6. Efecto mecánico y competición nutritiva

3. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL

- 3.1. Etapas en el proceso de formación del biofilm
- 3.2. Propiedades del biofilm bucal.
- 3.3. Ventajas del biofilm.
- 3.4. Importancia del biofilm en la caries dental

4. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

- 4.1. Formación de la placa dental y película adquirida.
- 4.2. Colonización por microorganismos
- 4.3. Reacción citotóxica
- 4.4. Medidas para eliminar el biofilm bucal

5. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PULPAR Y PERIAPICAL

- 5.1. Lesiones periapicales persistentes
- 5.2. Eliminación del biofilm del sistema del conducto radicular
- 5.3. Protocolo de irrigación

6. RESISTENCIA DEL BIOFILM FRENTE A ANTIMICROBIANOS

- 6.1. El papel del biofilm en la infección
- 6.2. Biofilm en la era de la biología molecular

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de la boca más importantes, como la caries, enfermedad periodontal, periodontitis apical, abscesos periapicales, son ahora sustentadas con el desarrollo de técnicas de Biología Molecular. Se considera que la cavidad oral del ser humano es el nicho ecológico con mayor diversidad conocido hasta ahora. En el año 2001 se estimaba que existían 500 especies de microorganismos en la cavidad oral, hoy se calcula que serían unas 700 las que la habitan. El conocimiento de la flora microbiana oral se había realizado por medio del cultivo de identificación bioquímica o cromatográfica de las especies aisladas.

Las especies que podían crecer en medios de enriquecimiento selectivos se han cultivado. Pero no se podía conocer todas aquellas especies que no pueden crecer en ellos y de las que se ignoraba sus necesidades nutritivas.

La cooperación metabólica entre bacterias puede ser importante para el establecimiento de comunidades de biofilm bucal. La coagregación bacteriana es un tipo de reconocimiento entre célula y célula y ésta puede ayudar a que las redes de alimentación puedan ser mejoradas. La importancia que tiene el biofilm bucal como comunidades bacterianas protegidas por una biopelícula de exopolisacáridos, les permite tener un mecanismo de adaptación, crecimiento y desarrollo.

El biofilm tiene propiedades como la heterogeneidad y fenotipos de las bacterias que crecen en el mismo, por lo que son más resistentes frente a

diversos antimicrobianos, manteniendo dicha característica incluso cuando se desprenden del biofilm.

También cuenta con un sistema que le permite comunicarse por medio de señales químicas llamadas quórum – sensing, mecanismo intercelular bacteriano de comunicación para la expresión de los genes que controlan su crecimiento.

Estas propiedades le permiten tener ventajas como protección a agresiones externas y mayor resistencia frente a los antimicrobianos. Esta última sustentada en que las bacterias activan genes que les proporcionan mayor resistencia.

En años recientes, los investigadores han empezado a ver la placa como biofilm. Es decir el biofilm bucal comprende organizaciones microbianas adheridas a una superficie dental envueltas en una matriz de exopolisacáridos.

Este cambio en la manera en que la placa es vista como un biofilm ha permitido que ésta tenga implicaciones importantes para los futuros esfuerzos en su prevención y tratamiento.

1. DEFINICIÓN DEL BIOFILM BUCAL

La forma natural de crecimiento de las bacterias es el biofilm. (1). Costerton definió el biofilm como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido, 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 que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o a la expresión de sus genes.

Se define como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie dental. (2)

El biofilm comprende a organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de exopolisacáridos.

Estas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierte en complejos difíciles de erradicarse de los ambientes donde se establecen. (3)

1.1 Estructura Bacteriana.

Desde el punto de vista estructural, la célula bacteriana está constituida de una membrana plasmática que rodea su citoplasma y en torno de la cual se encuentra una gruesa y rígida capa, la pared bacteriana. En el interior, además del citoplasma encontramos membranas correspondientes al núcleo o nucleoide e inclusiones, con (4) frecuencia de la superficie bacteriana salen prolongaciones filamentosas, son los flagelos y las fimbrias (Fig.1)

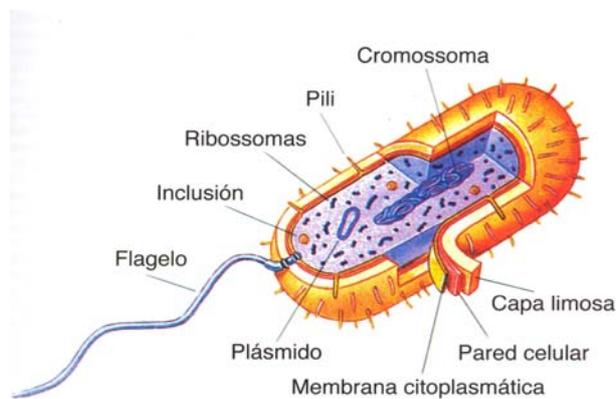


Fig. 1 Diagrama de una célula procariótica típica (Adoptado de Black, 1993)

Pared celular.

La composición de la pared celular tiene que ser estudiada según la reactividad que la bacteria presenta a la coloración de Gram. Este componente hace que el mundo bacteriano se clasifique en dos grupos: bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Pared celular Gram-positiva.

Su estructura básica está constituida por un polímero denominado péptidoglucano (Fig. 2), compuesto de unidades de naturaleza glucídica y peptídica y correspondiendo del 40 al 80% del peso seco de la pared celular. (Fig. 3).

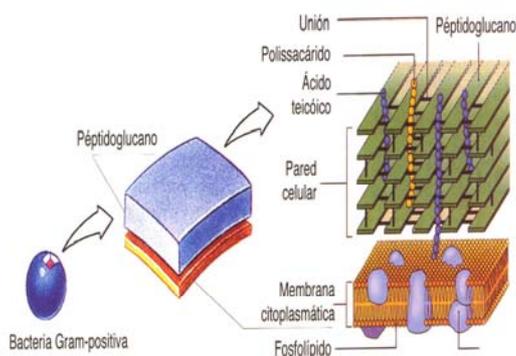


Fig. 2

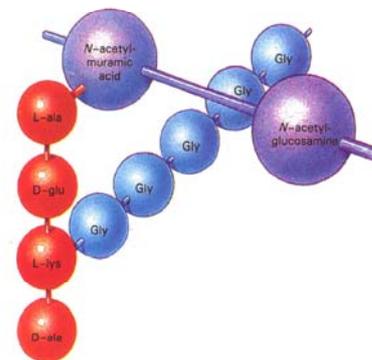


Fig. 3

Estrela. C, Ciencia Endodóntica adoptado de Black 1993

El péptidoglucano en función de su composición química garantiza rigidez a la pared celular y por lo tanto, protege las células del choque osmótico.

Hacen parte de esta estructura los ácidos teicoicos compuestos por ribitol o glicerolfosfato. Polisacáridos y proteínas también están presentes en la pared celular.

Pared celular gram-negativa.

Es considerablemente más compleja que la Gram-positiva. La capa del péptidoglucano, que corresponde del 5 al 10% de esta pared, presenta la

estructura básica. Y está localizada en el espacio periplásmico, área limitada externamente por la membrana externa, e internamente por la membrana citoplasmática. En ese espacio también están concentradas las enzimas hidrolíticas, denominadas genéricamente hidrolasas y proteínas de unión, que participan en mecanismos nutritivos de las células. (5)

La membrana externa, otro componente estructural de esta pared, en muchos aspectos es semejante, a la membrana citoplasmática, pero en relación a ella, posee un componente impar, el lipopolisacárido.

Estratégicamente esa estructura posee moléculas proteicas denominadas porinas, que constituyen verdaderos conductos a través de los cuales se garantiza la difusión de compuestos nutritivos simples, tales como azúcares, aminoácidos y algunos iones. Envolviendo el cuerpo bacteriano, la membrana externa confiere, junto con el péptidoglucano, al cual está unida por moléculas de lipoproteína, integridad a la célula bacteriana.

El componente lipoproteico, característico de la pared celular Gram-negativa, se encuentra embebido en la membrana externa y covalentemente unido al péptidoglucano; su principal función es estabilizar la membrana externa.

Localizado exclusivamente en la capa externa de la membrana se encuentra el lipopolisacárido (LPS). El LPS está compuesto por tres segmentos covalentemente unidos: *Lípido A*, *Centro* y *Antígeno O*. (Fig. 4)

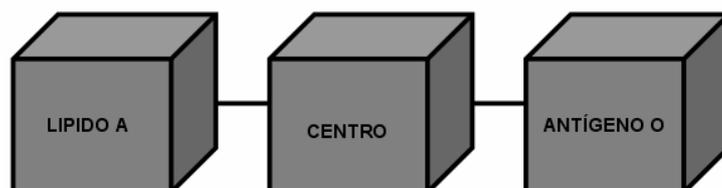


Fig.4 Estructura del lipopolisacárido

El lípido A está embebido en la membrana externa y comprende un lípido compuesto por unidades disacáridas, ácidos grasos saturados y grupos fosfatos. El lípido A es la endotoxina de las bacterias Gram-negativas, siendo liberada por la lisis de la célula también durante su crecimiento y multiplicación, expresando por consiguiente su potencial tóxico e induciendo complejas reacciones orgánicas.

El centro y el antígeno O son de naturaleza polisacárida. El primero está compuesto por pequeñas cadenas de azúcar, cuya estructura es más o menos común entre las bacterias Gram-negativas, mientras que el segundo comprende largas cadenas sacáridas siendo específicas de la especie bacteriana considerada.

Muchas bacterias Gram-negativas contienen como parte estructural de sus células una toxina denominada *endotoxina o antígeno "O"*.

Las endotoxinas son complejos fosfolípidos-polisacáridos-proteicos estables en calor. Son liberados de las células cuya integridad ha sido rota, aunque por si mismas son resistentes a las enzimas proteolíticas. Las endotoxinas son característicamente menos tóxicas y tienen una acción fisiológica diferente a las de las exotoxinas.

La actividad biológica de la endotoxina se debe a la fracción del lipopolisacárido que puede separarse de la proteína y el fosfolípido del complejo. La estructura del factor polisacárido del complejo es diferente para cada endotoxina, y es el determinante antigénico "O". (6)

Membrana citoplasmática.

Subyacente a la pared celular, está situada la membrana citoplasmática que desde el punto de vista estructural, es semejante a otros sistemas biológicos.

(Fig. 5)

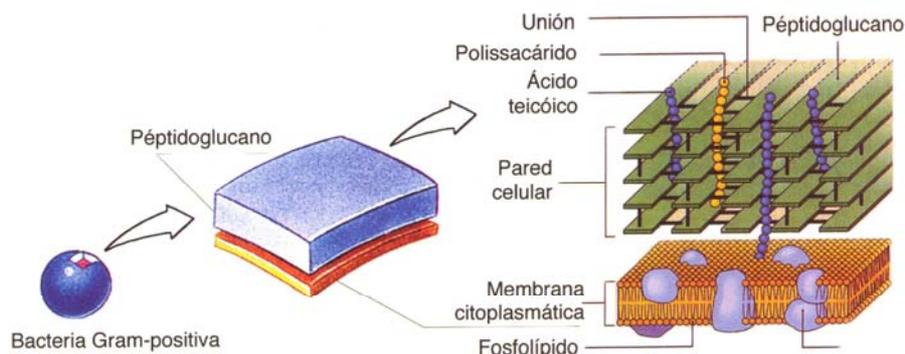


Fig. 5 Membrana citoplasmática

Estrela C. Ciencia Endodóntica (adoptado de Black 1993)

Está constituida por fosfolípidos anfipáticos que se disponen en dos capas adyacentes o sea forman una bicapa.

La membrana citoplasmática desempeña funciones importantes, es la sede de las reacciones básicas del metabolismo oxidante es responsable del control de

los constituyentes internos de la célula , controla los mecanismos de transporte de nutrientes a través de sus estructuras limitrofes, exigentes o no de energía - difusión mediada por cargador, transporte unido a la fosforilación y transporte activo, concentra fundamentalmente intermediarios biosintéticos y está involucrada en la división celular. Los mesosomos, invaginaciones típicas de la membrana citoplasmática de bacterias Gram-positivas, al aumentar su superficie, potencializan el papel biológico de esta estructura.

Estructuras internas.

El citoplasma debe ser considerado como un gel, una sustancia semifluida, compuesta aproximadamente por el 80% de agua y sustancias tales como enzimas y otras proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y una variedad de iones inorgánicos. Complejas reacciones químicas, de naturaleza catabólica y anabólica ocurren en el citoplasma.

De la misma forma en el citoplasma se identifican ribosomas y en muchas bacterias, las denominadas inclusiones citoplasmáticas.

Los ribosomas son estructuras constituidas por cerca del 60% de ácido ribonucleico (RNA) y el 40% de proteínas, siendo que algunos están libres en el citoplasma y otros asociados a la superficie interna de la membrana. Estas estructuras representan el lugar de la síntesis proteica.

Ciertas sustancias tienen la propiedad de fijarse específicamente a esas estructuras y así interferir en la construcción de macromoléculas, fenómeno que es la base de su potencial antimicrobiano.

Las inclusiones de modo general, son insolubles a medida que poseen sustancias densamente condensadas. Su naturaleza química varía según el microorganismo considerado, pero asumen aquí mayor importancia aquellas constituidas por polímeros de glucosa.

La propiedad de almacenamiento de esas sustancias ha sido observada en varias bacterias aisladas de la placa dental y dentina cariada.

Estas inclusiones representan material nutritivo de reserva, aquellas a base de glucosa van a garantizar la producción residual de ácido láctico, potente agresor del tejido a partir de su catabolización en la ausencia de carbohidrato exógeno.

Material genético.

La estructura procariótica de la bacteria no soporta un verdadero núcleo. El material nuclear, también denominado nucleóide está compuesto básicamente por ácido desoxirribonucleico (DNA) pero posee algún RNA y proteínas

asociadas a él, el DNA constituye un cromosoma único circular que concentra toda la información genética de la célula.

Su estructura fue descrita por Watson y Crick y esa macromolécula constituye una doble hélice, donde se identifican las bases nitrogenadas complementarias entre sí púricas (adenina y guanina) pirimídicas (timina y citosina), el azúcar desoxirribosa y residuos de fosfato. (Fig. 6 y Fig. 7)



Fig. 6

Modelo estructural del ácido desoxirribonucleico (DNA)

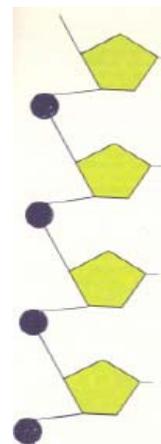


Fig.7

Estructura esquematizada de uno de los lados de la escalera en la molécula del DNA

Características principales del ADN.

Componentes:	<ul style="list-style-type: none">• Ácido fosfórico, desoxirribosa, adenina, guanina, citosina y timina.
Función	<ul style="list-style-type: none">• Comanda todo el funcionamiento de la célula, transmite la información genética a las otras células.
Localización	<ul style="list-style-type: none">• Nucleoide de las procariones.
Forma	<ul style="list-style-type: none">• Hélice doble.

Algunas bacterias poseen paralelamente pequeñas, y en su mayoría, moléculas circulares de DNA que no son parte del cromosoma, llamadas de plásmidos o DNA extracromosómico, que se replican independientemente del cromosoma.

Los plásmidos han asumido una expresión preponderante en la biología celular a partir de sus genes, codificando las siguientes funciones principales.

1. Codifican determinantes ecológicos.
2. Determinan la síntesis de factores de patogenicidad.
3. Son responsables de la resistencia bacteriana a diferentes antimicrobianos
4. Comandan la síntesis de proteínas que resultan en pili sexuales.

Endoespora.

En el mundo procariótico, una célula origina una espora en el proceso de esporulación, y una espora da origen a una célula en la forma vegetativa original, en el fenómeno denominado germinación; este proceso es una estrategia protectora a las condiciones estresantes y no un mecanismo de reproducción.

En el concepto actual la esporulación constituye un medio por el cual aquellas bacterias se preparan para la posibilidad de enfrentar condiciones nutritivas, físicas y/o químicas adversas. La resistencia a esos factores ambientales está relacionada a su composición química – pobreza en agua y riqueza en dipicolinato de calcio – y a la complejidad de su estructura.

Estructura externa de la pared celular.

Glucocáliz, flagelos, pili o fimbrias, estructuras fibrilares.

Glucocáliz.

El glucocáliz es el material viscoso que envuelve externamente a la pared celular y dependiendo de su espesor y / o organización, se denomina cápsula o capa limosa.

La cápsula que envuelve individualmente a la célula bacteriana de naturaleza principalmente polisacárida, pero puede ser un polipéptido. La capa limosa es un material extracelular más laxamente ligado, que circunda grupos de células;

los polisacáridos extracelulares sintetizados por las especies del grupo *Streptococcus mutans* son prototipos de la capa limosa.

Como consecuencia de su situación topográfica y de su composición química, el glucocáliz desempeña, de modo general, un papel expresivo en la nutrición bacteriana, en la defensa de la célula a la agresión de agentes físicos y químicos, en el estímulo de respuesta inmune en los mecanismos de patogenicidad.

Flagelos.

Los flagelos son estructuras filamentosas, característicamente presentes en bacilos y formas espiral. Su tamaño es significativamente superior a las dimensiones de la bacteria, estando compuestos por subunidades proteicas contráctiles, denominadas flagelina, se fijan a la cubierta celular a través de una región o cuerpo basal de naturaleza proteica.

Esos apéndices son responsables por la motilidad bacteriana, presentando, de la misma forma la propiedad de quimiotaxia, que consiste en dirigir las bacterias para ambientes ecológicamente favorables. La locomoción de ciertas formas espirales, como las espiroquetas, depende de la presencia de flagelos.

Pili o Fimbrias.

Clásicamente el término pili o fimbrias se refiere a otro tipo de estructura filamentosas, típica de bacterias Gram-negativas. Esos constituyentes celulares

son formados por subunidades proteicas, conocidas como pili o fimbrias son rígidos y comparativamente menores y más finos que los flagelos.

Existen dos tipos de pili – sexuales y somáticos. Las primeras participan de la transferencia del material genético, entre las células bacterianas y permitiendo el pasaje del material específico, los pili somáticas representan factores de patogenicidad, específicamente en lo que se refiere a la adherencia y colonización.

Estructuras Fibrilares.

Estas forman una capa fibrilar alrededor del cuerpo bacteriano y están presentes en bacterias Gram-positivas. Su composición química es variable, según la bacteria involucrada y comparativamente, corresponde a las pili somáticas de las Gram-negativas desde el punto de vista funcional.

En la cavidad bucal son varias las especies bacterianas que a través de esas estructuras logran su adherencia a las superficies orales.

1.2 Sistema ecológico de la cavidad bucal.

Desde el punto de vista ecológico, la cavidad bucal es un sistema de crecimiento abierto. Esto significa que nutrientes y bacterias son repetidamente introducidos y retirados del sistema (7)

El ritmo del flujo de la saliva es tan alto que sólo tienen éxito los organismos que pueden adherirse a las superficies de la cavidad bucal. La boca es el único lugar del cuerpo humano donde se encuentran tales superficies duras donde

los microorganismos establecen un anclaje firme y un medio nutricional favorable.

Factores que intervienen para remover a las bacterias. (Fig. 8)

1. Flujo salival
2. Flujo de líquido gingival
3. Masticación
4. Procedimientos de higiene bucal
5. Descamación de células epiteliales de las mucosas

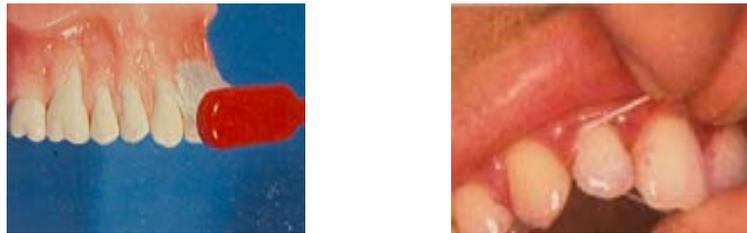


Fig. 8 Factores que intervienen para remover a las bacterias

Algunas bacterias pueden ser retenidas simplemente por haber logrado un refugio en fosetas y fisuras (Fig. 9a)



Fig. 9a Anatomía de fosetas y fisuras (Atlas de endodoncia Masson S.A. 1998)

Fisura de un molar que alcanza el límite entre esmalte y dentina y muestra zonas de descalcificación teñida de rojo.

Imagen de microscopio electrónico de barrido de la superficie oclusal de este molar (Fig.9b)

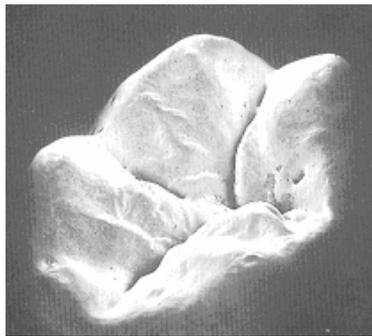


Fig. 9b Imagen microscopio electrónico (Atlas de endodoncia Masson S.A. 1998)

Extensión de la caries de fisuras. Corte histológico a través del centro de la fisura de un molar muestra la afectación de la dentina. (Fig. 10)

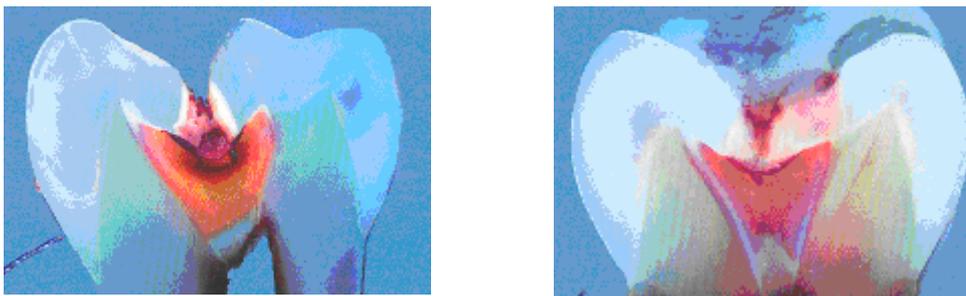


Fig. 10 Cortes histológicos. (Atlas de endodoncia Masson S:A. 1998)

Otros microorganismos tienen que confiar en mecanismos específicos de adherencia con el fin de sobreponerse a las intensas fuerzas de remoción de las superficies bucales. Las características de éstas son singulares y sólo

bacterias específicas tienen la capacidad de adhesión. Esto significa que la cavidad bucal alberga una flora microbiana singular y que la mayoría de sus miembros no son capaces de colonizar otro punto del cuerpo humano. La cavidad bucal consiste en varios puntos distintos, capaz cada uno de sostener el crecimiento de una comunidad microbiana característica. (8)

Así, existen enormes diferencias en la composición de las floras microbianas de las mucosas, la lengua, los dientes y el surco gingival.

Hasta se ha demostrado que la composición de la flora puede variar de un punto a otro en una sola superficie dentaria.

Los factores involucrados en la adherencia de los microorganismos a las superficies de la cavidad bucal son de importancia ecológica primordial.

1.3 Adherencia microbiana.

La adherencia microbiana involucra mecanismos fisicoquímicos específicos e influyen sobre ella no solo la interacción de las estructuras superficiales de las bacterias y de las superficies colonizables, sino también la actividad de la saliva como líquido de la suspensión.

Las superficies de los labios, carrillos, paladar, lengua, encías y dientes proveen todas las diferentes características para la colonización microbiana. Todas 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 en presión osmótica, pero también interferirá en la adherencia microbiana. (9)

La diferencia más importante entre las superficies bucales es la dada entre la mucosa, con su epitelio descamante y la superficie dentaria sólida (10). En la superficie dentaria en descamación, las bacterias deben colonizar continuamente. La superficie que se desprende de la mucosa bucal es una parte importante de la defensa del huésped contra la invasión microbiana.

Características fisicoquímicas de la adherencia microbiana.

Una característica importante de la bacteria es que pueden portar una carga eléctrica negativa neta y con ello tienden a repelerse entre sí electrostáticamente.

La superficie dentaria también está cargada negativamente y repele a las bacterias. (11)

A las células les influye además, la electrodinámica o fuerzas de Van der Waals. Estas fuerzas atraen con un alcance mayor que la fuerza electrostática repelente.

Las fuerzas de atracción y repulsión favorecerán una separación de las bacterias a distancias específicas de la superficie dentaria. (Fig. 11a)

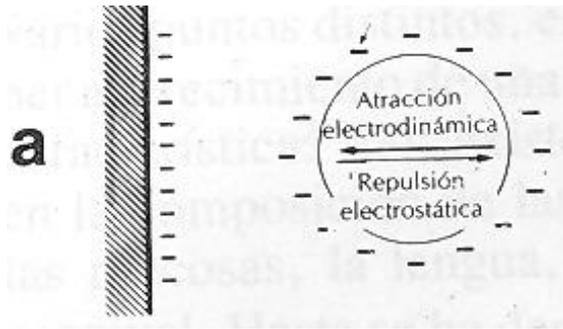


Fig. 11a Adherencia microbiana (Lindhe periodontología clínica. 118, 1986)

Esta brecha de separación está influida por la presencia de iones. Un pH ácido o una concentración incrementada de cationes reducirá la brecha. (Fig.11b)

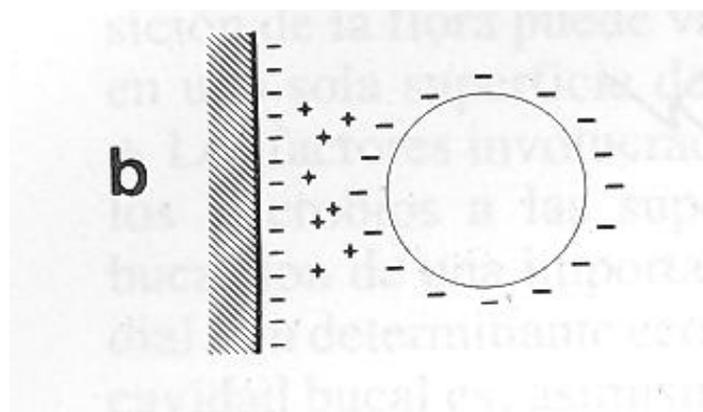


Fig. 11 b Adherencia microbiana (Lindhe periodontología clínica. 118, 1986)

La importancia del glucocáliz para la adherencia bacteriana es que representa una extensión hidrofílica más allá de la superficie muy cargada de la bacteria y así hace un puente para la separación que existe entre las bacterias y la superficie dentaria. (Fig. 11c)

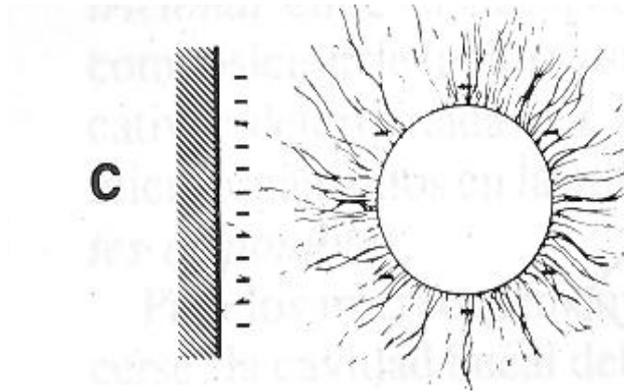


Fig. 11c Adherencia microbiana (Lindhe periodontología clínica. 118, 1986)

Cuando el glucocáliz entra en contacto con la superficie dentaria se pueden establecer otras fuerzas de atracción, tales como las uniones hidrogenadas, las formaciones de pares iónicos y las interacciones dipolo-dipolo.

Los pili o fimbrias bacterianos suelen ser bastante largos como para extenderse más allá del glucocáliz y así ayudar en la creación de un puente a través de la separación para establecer un contacto entre las bacterias y la superficie dentaria (Fig. 11d)

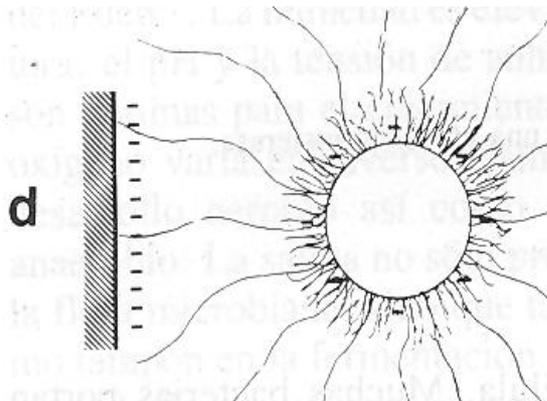


Fig. 11d Adherencia microbiana. (Lindhe periodontología clínica. 118, 1986)

Las moléculas llamadas adhesinas de las bacterias, son proteínas que se localizan en los pili o fimbrias y reconocen estructuras carbohidratadas llamadas lectinas.

1.4 Película adquirida.

La película adquirida es un recubrimiento fino derivado de la saliva que cubre la mayor parte de la superficie dentaria, formando con frecuencia la interfase entre la superficie del diente, la placa dental y el sarro.

Está formada por glucoproteínas derivadas de la saliva parece facilitar la adherencia microbiana. Los grupos glucidos de las glucoproteínas de la película pueden servir como receptores para las adhesinas microbianas.

El aspecto de la película puede variar.

El espesor medio de una película de 2 horas es de alrededor de 100micrones y aumenta alrededor de 400 en 24-48 horas.

Esto es sustentado por los estudios microscópicos de la colonización inicial de la superficie dentaria, las bacterias adheridas empiezan a crecer y multiplicarse, y los microorganismos de las fosetas y fisuras aumentan muy rápido de número (Fig. 12)

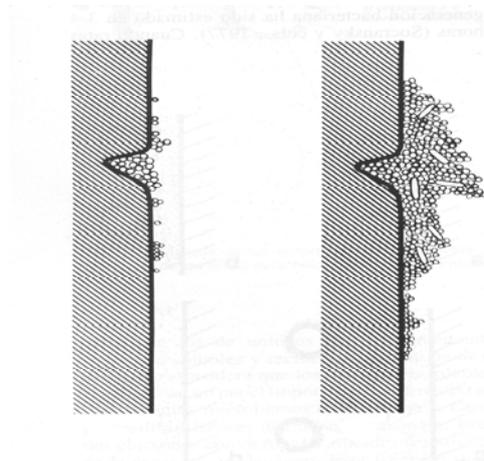


Fig. 12 Acumulos bacterianos (Lindhe periodontología clínica. 120, 1986)

2. INTERRELACIONES NUTRICIONALES ENTRE LAS BACTERIAS Y EL HUÉSPED.

Para que crezcan a las bacterias se les han de suministrar fuentes de carbono y de energía además de nitrógeno y los iones inorgánicos esenciales.

De las bacterias que se adhieren a puntos específicos de la cavidad bucal, solo se establecerán las que sean capaces de utilizar con eficiencia los nutrientes normalmente disponibles.

Deben tener además la capacidad de adaptarse rápidamente al cambio ambiental. Las bacterias con requerimientos nutricionales simples son capaces de crecer y multiplicarse si el medio les proporciona azúcar, amonio y otros iones inorgánicos esenciales. De estas moléculas la célula microbiana sintetiza sus propios componentes celulares.

Para lograrlo, la bacteria debe contar con un conjunto complejo de enzimas para catalizar todas las reacciones químicas exigidas. Si falta alguna enzima, no se formarán moléculas esenciales y el organismo no será capaz de crecer o multiplicarse a menos que esas moléculas sean provistas por el medio.

Muchas bacterias bucales tienen recursos incompletos y por lo tanto, requieren una cantidad de aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas del medio para crecer y multiplicarse. (Fig. 13)

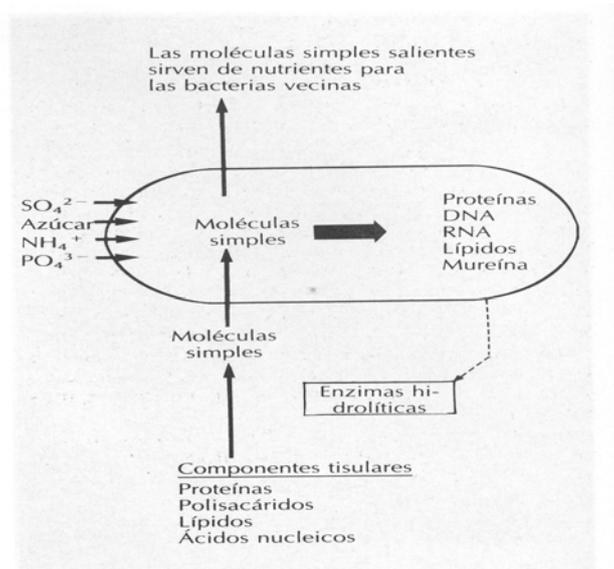


Fig. 13 Esquema de la nutrición microbiana (Lindhe periodontología clínica 122, 1986)

Cuando los recursos antes mencionados son producidos en cantidades mayores entonces pueden salirse de la bacteria y ser usados por otras bacterias como nutrientes. La mayoría de las bacterias que colonizan la mucosa y los dientes, tales como *Streptococcus* y *Actinomyces*, utilizan la saliva como nutriente principal y los azúcares como fuente de energía, en tanto que los microorganismos que colonizan las bolsas gingivales a menudo utilizan aminoácidos y los péptidos simples como fuente de energía. Cuando se utilizan los aminoácidos como dicha fuente, se producen *ácido carboxílico*, *amoníaco* y *sulfuro de hidrógeno*. La concentración de estas sustancias pueden alcanzar niveles tóxicos en las bolsas gingivales.

Los *Streptococcus* y *Actinomyces* producen lactato a partir de los azúcares y el lactato es utilizado por las *Veillonella*.

Las especies *Bacteroides* de pigmentación negra pueden requerir vitaminas K y hemina. El requerimiento de vitamina K del *Bacteroide melaninogenicus* subespecie *intermedium* es muy importante para ella.

2.1 Oxígeno y productos oxigenados como determinantes ecológicos.

El oxígeno y los productos oxigenados son determinantes ecológicos importantes porque hay grandes variaciones en la capacidad de las bacterias para crecer y multiplicarse con diversos niveles de oxígeno. (16)

Algunas bacterias mueren con niveles de oxígeno muy bajos, en tanto otras se desarrollan sólo en presencia de oxígeno. Las bacterias que proliferan en presencia de aire se llaman aerobias.

Las bacterias anaerobias son aquellas para las cuales el oxígeno es tóxico y no utilizan el O_2 en su mecanismos energéticos (17)

Loesche estudiando la sensibilidad de varias bacterias anaerobias al aire atmosférico, que contiene el 21% de oxígeno molecular las subclasificó en dos grupos. Las bacterias anaerobias moderadas soportan un ambiente con el 2-8% de oxígeno molecular.

Las anaerobias estrictas no pueden concretar su metabolismo en ambientes con concentraciones superiores al 0.5% de oxígeno. Las bacterias anaerobias facultativas soportan ambientes con y sin oxígeno.

2.2 Potencial Oxidorreducción.

La mayoría de las bacterias, consumen grandes cantidades de oxígeno y generan un bajo potencial de redox (oxido reducción en su medio).

Cuando se transfieren los electrones de un compuesto a otro, se dice que tiene lugar una reacción de óxido- reducción. (18)

- a) Se dice que se oxida el compuesto que pierde o dona sus electrones.
- b) Se dice que reduce el compuesto que gana o acepta electrones.

La síntesis bacteriana también requiere una fuente de energía constante disponible, que por lo general se obtiene a partir de una serie de reacciones de oxido -reducción asociadas. (19)

Estas reacciones requieren a su vez sustratos oxidables y sustancias reducibles que pueden actuar como intermediarias y al último como receptoras de hidrógeno.

2.3 Concentraciones de iones de hidrógeno.

La escala de concentraciones de iones de hidrógeno para el desarrollo bacteriano se encuentra entre un pH de 3 y 4 unidades; el grado óptimo se presenta en un límite menor a una unidad. La mayoría de las bacterias patógenas crecen mejor en un pH de 7.2 o 7.6. Sin embargo existen bacterias

formadoras de ácidos, como los *Lactobacillus*, que producen y toleran ácidos de un pH de 3 o menos aún. (20)

2.4 Importancia del potencial óxido-reducción.

El potencial de óxido –reducción del medio es importante para la iniciación del desarrollo de una bacteria de determinada especie.

Un bajo potencial de redox (*óxido-reducción*) puede favorecer el desarrollo de algunas bacterias anaerobias.

Intracelularmente o en cualquier punto caracterizado por un potencial de redox bajo, el oxígeno es convertido en productos altamente reactivos y potencialmente destructivos.

El oxígeno es reducido y se forman aniones de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales oxhidrilos.

De éstos, el peróxido de hidrógeno y los aniones de superóxido no son tóxicos por sí mismos pero pueden generar los radicales oxhidrilos más devastantes.

(21)

Las bacterias tienen que estar equipadas con un complicado sistema de enzimas que desaga los productos oxigenados nocivos con el fin de sobrevivir en un medio.

La acción concertada de la superóxidasa dismutasa, la catalasa y las peroxidases convierten los aniones de superóxido y el peróxido de hidrógeno en agua, con lo cual previene la formación de radicales oxhidrilos.

Los productos oxigenados pueden dañar las membranas celulares e inactivar enzimas. Estos productos son microbicidas es decir tienen la capacidad de (destruir microbios). Uno de los puntos primarios de lesiones de las bacterias es el DNA cromosómico.

Pero las células están equipadas asimismo con sistemas enzimáticos que reparan el DNA y otros puntos celulares dañados por productos oxigenados. Los organismos que carecen de algunas de estas enzimas que puede no ser capaces de sobrevivir en un medio aerobio y son anaerobios. (22)

Los leucocitos también pueden tener sistemas microbicidas que trabajen en condiciones anaerobias. (23). Los productos liberados por los leucocitos no sólo matan los microorganismos invasores, sino que los productos oxigenados y las proteasas lisosómicas pueden causar lesiones tisulares extensas. (24)

El desarrollo microbiano en la boca crea puntos con distintos niveles de oxígeno. El nivel de oxígeno y el potencial de redox (oxido-reducción). Son particularmente bajos en los puntos caracterizados por abundantes acúmulos de bacterias.

La influencia del oxígeno es un factor importante ya que la microbiota endodóntica necesita una muy baja disponibilidad de oxígeno en conductos radiculares infectados. Aún cuando hay una exposición oral directa, la concentración de oxígeno permanece reducida, en particular en porciones apicales del sistema del conducto radicular, donde se produce un bajo potencial de oxido-reducción en el tejido necrótico que favorece el crecimiento de bacterias facultativas.

Dichas bacterias pueden en un principio, colonizar la cámara pulpar, pero por la desaparición de oxígeno y bajo potencial de oxidación reducción resultante, se fomenta el desarrollo bacteriano anaeróbico. (25)

2.5 Factores Nutricionales.

Una nutrición adecuada es fundamental para el crecimiento de las bacterias, los componentes del tejido pulpar desintegrado aportan una fuente nutricional importante, al menos durante las fases iniciales de colonización bacteriana.

Otro factor esencial en la nutrición bacteriana es el exudado inflamatorio que contiene elementos séricos y hemáticos excretados de alteraciones inflamatorias concomitantes en los tejidos pulpares o periapicales restantes. Si existe comunicación directa con el medio oral, la saliva brinda elementos que fomentan el crecimiento bacteriano. Como los restos del tejido pulpar, los

líquidos hísticos y la saliva aportan proteínas que favorece el crecimiento de las bacterias que los emplean. (26)

2.6 Efecto mecánico y competición nutritiva.

El establecimiento del proceso infeccioso hace que los microorganismos ejerzan una presión mecánica sobre los vasos y nervios que llegan a la pulpa. Consecuentemente hay compromiso de suministro sanguíneo y alteración de las condiciones ecológicas de área, factores que soportan la formación de una microbiota gradualmente más compleja, ocurriendo de la misma manera, la presión en las terminaciones nerviosas. Al mismo tiempo, la instalación del proceso exige que los microorganismos compitan con el huésped por sustancias necesarias al metabolismo de ambas células. (27)

3. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL.

La caries empieza solamente cuando existen acumulaciones bacterianas (biofilm) en la superficie de los dientes, los sitios con mayor frecuencia que conducen a la retención de estas comunidades son surcos, fisuras, y contactos interproximales.

Las lesiones cariosas no se producen en los dientes que no han hecho erupción, es decir antes de que sean accesibles a la colonización bacteriana.

De igual manera el cemento se mantiene libre de caries a menos que se exponga al medio oral como en la recesión gingival y bolsas periodontales. (28)

La capacidad de formación del biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos. (29)

Se describe al *Streptococcus mutans* como el principal patógeno bacteriano.

Se identifica a *Actinomyces* como posibles patógenos en caries radicular (o del cemento). (30)

Hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilm. (Fig. 14)

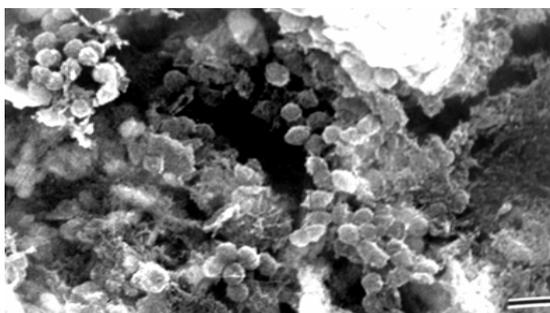


Fig. 14 Mostrando la presencia de cocos y bastones Gram-positivos iniciando la formación del biofilm. (Nori Y, Ehara A, Kawahara T. Participación of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis JOE 2002, 28: 679-683.)

Aunque la composición del biofilm es variable en función de su estudio, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además del agua y de las células bacterianas es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. (31)

En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias.

En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm una de las preguntas era cómo surgían las bacterias del interior del biofilm y podían tener acceso a los nutrientes o a el oxígeno.

Estudios realizados utilizando microscopía con focal, han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo del agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH y oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm. (32,33, 34)

3.1 Etapas en el proceso de formación del biofilm.

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie dentro de un estructurado ecosistema. (Fig. 15)

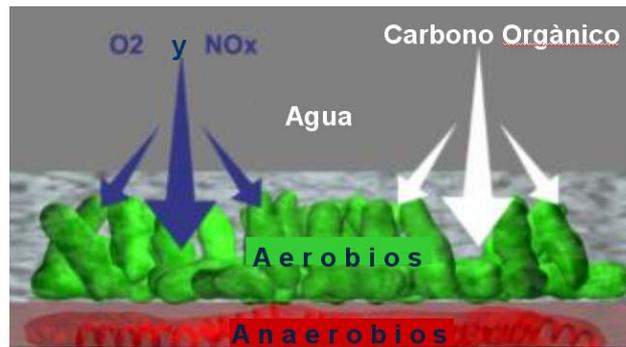


Fig. 15. Etapa inicial del proceso de formación del biofilm.

Al hablar de un estructurado ecosistema quiere decir que los microorganismos persisten unidos a la superficie y no como organismos flotando libremente. (35)

La flotación libre o las bacterias planctónicas encuentran la superficie condicionada y forma un accesorio reversible, a veces transitorio y a menudo dentro de segundos o minutos. (Fig. 16)

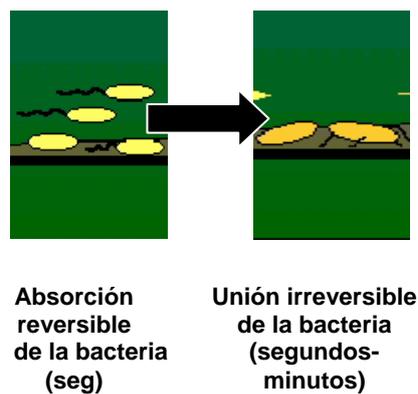


Fig. 16

Este accesorio llamado adsorción es influenciado por las cargas eléctricas que continúan las bacterias por las fuerzas de Van der Waals y por la atracción electrostática,

En bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas Aeruginosa*, *Escherichia Coli*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I y IV son importantes para la etapa de adherencia primaria. (36)

Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram-positivas inmóviles como Estafilococos y microbacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram-positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie, en esta primera etapa de adherencia primaria. (37)

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía incluso en una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales.

La disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios en la osmolaridad, en el pH, la tensión del oxígeno y la temperatura,

disparan la transición de la forma planctónica a un crecimiento sobre una superficie.

Los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y son producidos por la misma bacteria del biofilm. Participan de forma fundamental en el desarrollo del biofilm, pues su intervención mantiene la integridad de todo. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, por lo que pueden interactuar con distintos antimicrobianos, de forma que estos últimos quedan atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias. Los propios exopolisacáridos producidos por una bacteria puede actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias y de la misma forma pueden atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a distintos tipos bacterianos, lo cual supone una ventaja para el desarrollo bacteriano.

Los exopolisacáridos actúan también retirando desechos del medio, lo cual a su vez favorece el desarrollo bacteriano. La composición química de estos determina la capacidad de adhesión de los mismos lo que a su vez favorece la adhesión de las bacterias a las superficies. Por último los exopolisacáridos participan en funciones de protección de las bacterias, pues evitan su desecación.

La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar el biofilm, o incluso puede producir su desaparición. (38)

3.2 Propiedades del biofilm bucal.

Heterogeneidad. Lo que hace que organizaciones únicas puedan estar conformadas por *bacterias, hongos, protozoos*. Se ha visto que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno.

Fenotipos en el biofilm. El fenotipo es la consecuencia de la información genética que define una o varias características de un ser vivo. Propiedades observables de un organismo, resultante de la interacción de su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

Los fenotipos de las bacterias que crecen en los biofilm son más resistentes frente a diversos antimicrobianos y mantienen esta resistencia incluso cuando se desprenden del biofilm (39)

Señales en el biofilm. Dentro del biofilm, las bacterias tienen capacidad para comunicarse entre ellas, ya sea por medio de señales químicas llamado quórum-sensing un mecanismo intercelular bacteriano de comunicación para la expresión de genes que controlan su crecimiento. A través del quórum sensing las bacterias responden a su agregación y regulan la expresión de sus genes y la diferenciación celular para optimizar su fisiología en un ambiente particular. La capacidad de la célula bacteriana para comunicarse y comportarse

colectivamente como un grupo proporciona ventajas significativas en la colonización, la defensa contra otras bacterias, la adaptación a condiciones físicas variables, la diferenciación celular y la evolución de la especie. (40)

3.3 Ventajas del biofilm.

1. Protección frente a sus agresiones externas y mayor resistencia frente a los antimicrobianos. (41,42)
2. Ventajas nutricionales, aporte de nutrientes y eliminación de desechos.
3. Proporciona un medio ambiente adecuado para el desarrollo bacteriano
4. Capacidad de intercomunicación entre las bacterias (43,44)

3.4 Importancia del biofilm en la caries dental.

La importancia que tiene el conocimiento del biofilm bucal en el desarrollo de lesiones cariosas es fundamental ya que este es capaz de producir ácidos para desmineralizar la estructura dental este se adhiere a la superficie dental y se denomina placa bacteriana o placa dentobacteriana.

Las bacterias de la placa metabolizan a los carbohidratos para obtener energía y producen ácidos orgánicos como subproductos. Los ácidos producen la lesión cariosa, al disolver la matriz de los cristales de esmalte. Las lesiones cariosas progresan debido a las fluctuaciones del pH a nivel de la superficie del

diente, con los cambios en el metabolismo de la placa, siendo estimulada ésta por azúcares simples como la sucrosa.

Las bacterias orales no forman colonias solitarias sino pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies, unidas que se encuentran en una matriz extracelular con diferentes propiedades y ventajas propicias para su crecimiento y desarrollo. (45)

4. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Las enfermedades de la boca más importantes, como la caries dental, enfermedad periodontal, se producen por la placa dental ésta placa es un biofilm.

Timmerman (46) señala que la presencia de la placa dental con especies bacterianas anaerobias específicas, induce al desarrollo de la enfermedad periodontal.

Actualmente Marsh y Martin definen a la placa como una comunidad microbiana compleja que se encuentra en la superficie de los dientes, embebida en una matriz de origen bacteriano y salival. (47)

La placa dental se clasifica según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente y por su potencial patógeno en *cariogénica* y *periodontopatogénica*. La placa dental supragingival se encuentra en las superficies dentales y está constituida predominantemente por flora bacteriana sacarolítica (capaz de hidrolizar el azúcar). Gram-positiva en las cuales se encuentran microorganismos *cariogénicos*, sin embargo es posible que esta placa se extienda hasta el fondo del surco gingival o de las bolsas periodontales, y está constituida principalmente por flora bacteriana proteolítica Gram-negativa en la cual se encuentran microorganismos *periodontopatogénicos*. (48)

Dentro de las especies consideradas “marcadores de periodontitis” se han establecido dos categorías: las muy patógenas: *Actinobacillus Actinomycete*

mcomitans, Porphyromonas gingivalis y Bacteroides forsythus; las patógenas: Prevotella intermedia y Treponema denticola. (49)

La placa dental incorpora todas las características de la arquitectura de un biofilm y de la interacción microbiana de la comunidad. (50)

4.1 Formación de la placa dental y película adquirida.

La formación de la placa dental es el resultado de una serie de procesos complejos que involucran una variedad de bacterias y componentes de la cavidad bucal del hospedero. (51)

Estos procesos comprenden en primer lugar la formación de una película adquirida.

Película adquirida.

La formación de la película adquirida sobre la superficie del diente es la etapa inicial en la formación de la placa dental.

Inmediatamente después de cepillarse los dientes, comienzan a depositarse sobre la superficie del diente una película adquirida, compuesta por proteínas y glucoproteínas aniónicas unidas a la hidroxiapatita del esmalte. Estas proteínas y glucoproteínas provienen de elementos salivales y del fluido crevicular.

Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electroestáticas, tipo Van der Waals. Es por ello que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfato con carga negativa, interactúan con proteínas y glucoproteínas salivales y del fluido crevicular con carga positiva.

La película formada opera como barrera de protección proporcionando lubricación a las superficies impidiendo la desecación del tejido. Además posee moléculas que funcionan como sitios de unión para la adherencia de microorganismos.

Luego de la formación de la película adquirida ésta comienza a ser colonizada por microorganismos residentes de la cavidad bucal.

Este proceso se caracteriza por una fase irreversible en la que se producen interacciones de alto rango, generándose un acercamiento inicial de las bacterias a la superficie de la película.

Fase irreversible en la que se producen interacciones de corto rango, entre componentes tanto de la bacteria como del huésped.

4.2 Colonización por microorganismos específicos.

Esta comprende varias fases que involucran la deposición, adhesión, coagregación, crecimiento y reproducción de los microorganismos adheridos sobre la película adquirida. (52)

Algunos mecanismos por los cuales las bacterias se adhieren a la película adquirida son mediante moléculas específicas denominadas adhesinas presentes en la superficie bacteriana que se une con receptores específicos de la película a través de estructuras proteínicas fibrosas, llamadas fimbrias que se fijan a la película por la formación de puentes de calcio y magnesio con carga (+) que permite la unión de componentes bacterianos cargados negativamente a la película que también posee carga (-). Y a través de polisacáridos extracelulares sintetizados a partir de la sacarosa, que permiten la unión de polisacáridos bacterianos a la superficie de la película.

Un aspecto que juega un papel preponderante en el crecimiento y posterior maduración de la placa dental, es el fenómeno de coagregación entre células microbianas en las últimas fases de la formación de la placa es probable que predomine la coagregación entre especies Gram-negativas anaerobias, como *Fusobacterium Nucleatum* , *Porphyromonas gingivalis*.

Este fenómeno provee las condiciones para la interacción patogénica característica de las infecciones periodontales. Si esta placa supragingival temprana no es regulada debido a la ausencia de la higiene oral adecuada, la composición bacteriana puede madurarse en una flora más compleja en un

panorama de tres etapas. (53). La primera etapa son cocos predominantes Gram positivos. (Fig. 17)

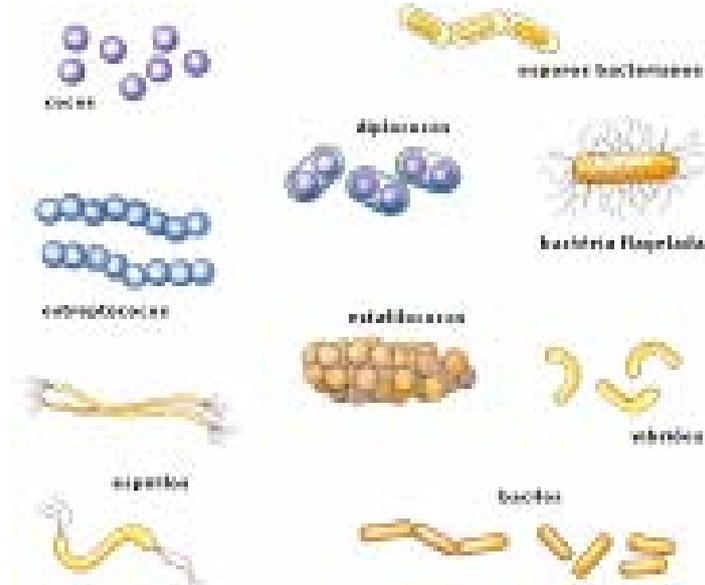


Fig. 17 Morfología de las bacterias

En la segunda etapa, aparecen microorganismos filamentosos, y durante la tercera etapa los espirilos y espiroquetas. (54) (Fig. 18)

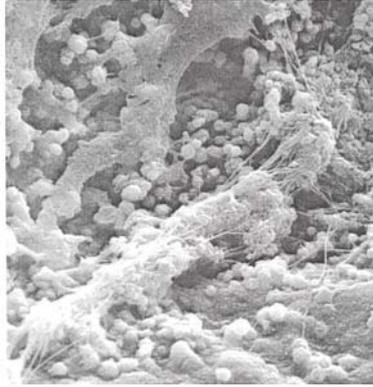


Fig. 18

(Serrano Jorge Herrera David, Dental Plaqué as a Biofilm How to eliminate it RCOE. Vol 10, 4, jul , ago. 2005)

Cuando queda establecida la gingivitis, el cultivo de las bacterias de los puntos infectados revela un incremento en la cantidad de bacterias anaerobias en relación con las anaerobias facultativas. (55)

Es frecuente hallar, entre las bacterias anaerobias, *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides melaninogenicus subespecie intermedius*. (56)

Frotis con tinción de Gram de placa supragingival. Los cocos constituyen una proporción relativamente pequeña de la flora microbiana. Predominan los organismos filamentosos.

En las primeras etapas de la periodontitis, la flora microbiana de la bolsa gingival es similar a aquella de la gingivitis. (57)

Entre estas bacterias, el *Bacteroides gingivalis* parece tener una importancia específica. Y en casos avanzados de enfermedad periodontal suele contener cantidades elevadas de espiroquetas.

4.3 Reacción citotóxica.

El biofilm de la superficie dentaria contiene y libera enzimas como las proteasas, *hialuronidasas*, *colagenasas*. (58,59).

Estas enzimas podrían ser la causa directa de las lesiones de los tejidos epitelial y conectivo.

Un lipopolisacárido, una endotoxina de las bacterias Gram negativas, puede activar el sistema de complemento y además, es citotóxico para las células del huésped.

La endotoxina puede contribuir a algunos de los cambios tisulares observados en las lesiones gingivales.

4.4 Medidas para eliminar el biofilm bucal.

Las medidas para eliminar el biofilm bucal se basa en entender que la placa dental es un ejemplo claro de una biopelícula de biofilm.

Se considera que el biofilm tiene una fase de crecimiento distinto de las bacterias que se encuentran en estado planctónico, es decir, en suspensión.

(60)

Se ha determinado que las células bacterianas de la biopelícula exhiben características biológicas que difieren marcadamente de las bacterias que están aisladas o en suspensión. (61)

Las enfermedades dentales, que ocurren en sitios donde existe una microflora contenida en un biofilm son el principal problema de salud oral en el mundo sobre todo en países en desarrollo. (62)

Es por ello, que un mejor entendimiento del papel del biofilm en su inicio y progresión será esencial si se quiere reducir su prevalencia. (63)

Por lo presentado hasta ahora, al organizarse en biofilms las bacterias se convierten en adversarios a tener en cuenta pues son más resistentes a las distintas actuaciones encaminadas a combatirlas. (64)

La caries dental puede prevenirse no sólo atacando directamente a los patógenos asociados, sino también interfiriendo con los factores de su crecimiento. (65, 66, 67, 68.)

Las estrategias que son consistentes con su prevención incluyen:

- a) inhibición de la producción de ácido (empleo de fluoruros)
- b) interferencia en el desarrollo de la biopelícula empleo (de agentes antiplaca como la *clorhexidina* y el *triclosán*).
- c) evitar la ingesta de azúcares fermentables entre las comidas.
- d) consumir alimentos y bebidas que contengan azúcares no fermentables (*sorbitol, xilitol, aspartame, y sacarina*).
- e) estimulación del flujo salival después de las comidas principales (empleo de gomas de mascar libres de azúcar.)

Frente a los biofilm los estudios reportan que podemos actuar con las siguientes medidas:

1. se pueden realizar cambios en las características físicas y/químicas de las superficies a las que se adhieren los biofilm de forma que se impida o retrase la adhesión de los mismos. (69)

2. se pueden realizar tratamientos que cambien el medio ambiente bacteriano (tratamiento ecológico), lo que imposibilitaría el desarrollo de determinados biofilm; de ésta forma, mediante un buen control de la placa supragingival, se dificulta el desarrollo del biofilm patógeno. (70)
3. Una vez que el biofilm se ha desarrollado fundamentalmente podría actuarse de dos formas: por medios físicos/químicos (a nivel supragingival por medio del cepillado y profilaxis dental) o bien a nivel subgingival por medio de raspado y alisado radicular, o cirugía periodontal.
4. A nivel supragingival se pueden utilizar distintos antisépticos, y a nivel subgingival distintos antibióticos.

Acción de los colutorios en el biofilm.

Conociendo las causas de la resistencia del biofilm se ha propuesto el desarrollo de medicamentos que eviten la adherencia o inhiban la persistencia. (71).

Se pueden realizar cambios en las características químicas de las superficies a las que se adhiere los biofilm de modo que se impida o retrase la adhesión de las mismas. Los distintos colutorios deben pasar una serie de estudios que atestigüen su inocuidad para el ser humano y la eficacia en el control de los biofilm. (72,73). Hasta el momento, los estudios encaminados a comprobar la eficacia de un determinado colutorio se realizaba, en primer lugar mediante estudios in vitro con bacterias planctónicas. Las bacterias que se encuentran en la saliva pueden ser consideradas bacterias planctónicas (bacterias que flotan en la saliva).

Sin embargo, las bacterias que se encuentran en una superficie dura (dientes, reconstrucciones, prótesis e implantes) forman una película adherente. (74).

El concepto y apariencia de la placa dental ha ido variando a lo largo de la historia dependiendo de los medios técnicos disponibles para su estudio.

Una vez que un determinado colutorio muestra su eficiencia en los estudio in vitro, el siguiente paso consiste en observar la efectividad de los mismos en modelos de estudio in vivo para analizar las posibles interacciones del producto con el medio bucal, con la saliva, con otros productos utilizados en la higiene bucal.

Dentro de los estudio in vivo destacan los estudio de Pan, Netuschil y Arweiler (75,76, 77, 78,79).

En este estudio se pidió a los voluntarios que se abstuviesen de cualquier tipo de higiene bucal durante un periodo (de uno a tres días), transcurrido el cual se les solicitó que se enjuagaran bien, con el colutorio test, y después, con el placebo, durante unos segundos. Se recogieron las muestras de placa dental de los voluntarios, se dejó un tiempo de aclaramiento (una semana) y se repitió el proceso cambiando la asignación de colutorios. Las muestras de placas recogidas se tiñeron mediante un proceso que mostró la vitalidad de las bacterias presentes en la placa.

Así, en los estudios Pan se encontró que los colutorios con aceites esenciales fueron capaces de producir una mortalidad de 78.7% de las bacterias frente al 27.9% producido por el colutorio control (suero salino). En los estudio de Netuschil se mostró que los colutorios de clorhexidina fueron capaces de penetrar en el biofilm y tener gran capacidad bactericida. (Fig. 19)

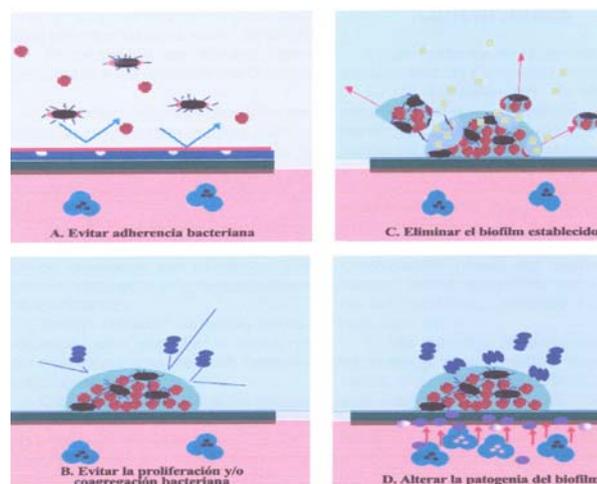


Fig. 19 Mecanismos de actuación de los colutorios sobre los biofilms.

Pero no todos los colutorios con clorhexidina muestran la misma efectividad, dependiendo de la formulación que presenten otros colutorios (*aceites esenciales, octenidina, fluoruro estañoso, hexetirina*) muestran una correcta acción bactericida pero menor que la clorhexidina. Los colutorios con extractos de plantas y los colutorios con *triclosán* muestran una actividad bactericida escasa en este tipo de estudios.

Los colutorios de uso domiciliario deben mostrar su eficacia mediante ensayos clínicos de una duración mínima de 6 meses que cumplan las normas de la ADA (Asociación Dental Americana). Actualmente sólo colutorios con *aceites esenciales y clorhexidina*, han mostrado resultados positivos en este tipo de estudios y han sido probados por la FDA (Federación Dental Americana). (80)

5. BIOFILM Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PULPAR Y PERIAPICAL.

El papel fundamental de los microorganismos en la etiopatogenia de las patologías pulpares y periapicales está establecido por los estudios de Kakehashi (81) Moller, Sundqvist. (82,83)

El rol de las bacterias presentes en la cavidad oral en la inducción de la inflamación periapical, fue confirmado experimentalmente por Moller en 1981, cuando en su experimento, expuso el tejido pulpar de dientes de monos a la cavidad oral durante 7 días. Los dientes fueron posteriormente sellados y examinados a los 6 meses, observando que todos los dientes infectados fueron contaminados con microorganismos como *Streptococcus – hemolítico*, *Enterococcus coniformes* y anaerobios con *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Petoestreptococcus*. Y el 90% de los dientes desarrollaron lesiones periapicales. (84)

El estudio de Kakehashi mostró que cuando pulpas de ratas libres de bacterias eran comunicadas y dejadas abiertas a la cavidad oral, éstas se mantenían vitales y no se daba el desarrollo de lesiones periapicales a nivel apical, sin embargo cuando a éstas ratas se les inoculó flora bacteriana normal de otros animales, las pulpas se necrosaron y se desarrollaron lesiones a nivel periapical. (85)

La pulpa dental y los tejidos periapicales tienen la capacidad de reaccionar ante una gran diversidad de irritantes. Las bacterias que invaden el espacio pulpar

son uno de los principales irritantes, causando inflamación de este tejido, que al persistir puede resultar en la necrosis del mismo. Dicha destrucción tisular permite que las bacterias, sus productos y otros irritantes alojados en el tejido necrótico se difundan desde el conducto hacia el periápice, produciendo una lesión inflamatoria de dicha región. (86)

La mayoría de las bacterias viven en un biofilm y pueden colonizar cualquier superficie. (87)

Por lo tanto las especies bacterianas son esenciales en la progresión y perpetuación de las lesiones pulpares y periapicales.

Ante las investigaciones de Sundqvist (88) se creía que las bacterias eran únicamente anaerobias facultativas pero con nuevas técnicas de cultivo él establece la presencia de bacterias anaerobias estrictas. Las pulpas necróticas presentan una flora polimicrobiana caracterizada por una amplia variedad de combinaciones de bacterias.

La mayoría de las especies bacterianas aisladas de infecciones endodóncicas son anaerobias estrictas.

Las bacterias anaerobias estrictas no concretan su metabolismo en ambientes con concentración superior al 0.5% de oxígeno. (89)

La presencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares esta íntimamente relacionado con la presencia o ausencia de oxígeno para la

sobrevivencia de cada especie. En las porciones apicales el potencial óxido-reducción es menor y por lo tanto solo habrá presencia de bacterias anaerobias facultativas y estrictas.

Algunas bacterias son dependientes de los metabolitos secretados por otras bacterias para su supervivencia.

La importancia clínica radica en la eliminación del tejido necrótico las bacterias, sus productos y subproductos (*endotoxinas*).

La pared celular de las bacterias Gram-negativas, como la *Porphyromona*, *Fusobacterium*, contiene endotoxinas (*lipopolisácaridos* (LPS)). Este componente bacteriano es el principal factor de patogenicidad y ejerce un efecto en la amplificación de las reacciones inflamatorias.

Las endotoxinas son antígenos no específicos que son pobremente neutralizados por los anticuerpos. Son además capaces de activar la vía del complemento sin la participación de anticuerpos, lo cual resulta en la activación de las quininas y de la cascada de coagulación.

Además estimula la liberación de interleuquina (IL1). Es capaz de inducir respuestas inflamatorias a nivel periapical aún en pequeñas cantidades así como destrucción ósea.

Los microorganismos de importancia en endodoncia según Nair son.

(Tabla 1)

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA ENDODÓNTICA

Anaerobios		Facultativos-Aerotolerantes-Microaerófilos	
Cocos Gram+	<i>Peptostreptococcus</i>	Cocos Gram+	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>
Bacilos Gram+	<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Propionibacterium</i>	Bacilos Gram+	<i>Actinomyces</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Corynebacterium</i>
Cocos Gram-	<i>Veillonella</i>	Cocos Gram-	<i>Neisseria</i>
Bacilos Gram-	<i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Selenomonas</i>	Bacilos Gram-	<i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella</i> <i>Campylobacter</i>
Espiroquetas	<i>Treponema</i>	Levadura	<i>Candida</i>

Tabla 1

Estrela C. Ciencia Endodóntica, modificado por Fair, 2005

5.1 Lesiones periapicales persistentes.

La causa más común de fracaso en el tratamiento endodóntico se relacionan a la instrumentación. Numerosos estudios han mostrado la persistencia de infecciones endodónticas causadas usualmente por *Enterococcus faecalis*.

Estas bacterias, poseen resistencia inherente a los agentes antimicrobianos y otros factores de patogenicidad.

Existen estudios que sustentan que el *Enterococcus faecalis* resiste a las medicación intraconducto formando biofilm. *Enterococcus faecalis* muestra ser resistente a los medicamentos usados durante el tratamiento y es uno de los pocos microorganismos que han mostrado ser resistentes al efecto antibacterial del hidróxido de calcio. Los factores que contribuyen a la resistencia también incluyen la cubierta impenetrable de polisacáridos, de la biopelícula o biofilm y su habilidad para sobrevivir.

Las células bacterianas que residen dentro de un biofilm crecen más lentamente que las células planctónicas como consecuencia las células del biofilm asimilan los agentes antimicrobianos más lentamente. Además el agotamiento de los nutrientes puede forzar a las bacterias a una fase inactiva o inmóvil de crecimiento con la cual se protegen contra lo antimicrobianos (90).

5.2 Eliminación del biofilm del sistema del conducto radicular.

El objetivo principal del tratamiento endodóncico es la eliminación de la microflora (biofilm) y restos necróticos del sistema de conducto radicular, lo cual se lleva a cabo mediante la limpieza y desinfección y conformación del sistema del conducto radicular. (91)La limpieza se logra generalmente con la instrumentación, irrigación y utilización de medicación intraconducto.

5.3 Protocolo de irrigación ⁽⁹²⁾

1. Hipoclorito de sodio al 1 y 2.5% (calentarlo y irrigar 2ml por conducto aprox. o hasta que el líquido del conducto sea claro sin detritus.)
2. EDTA al 17% 5 o 10ml. Después de la conformación del conducto (activado con el cono maestro por 1 min.).
3. Irrigación final con NaOCL se deja como apósito intraconducto Ca(OH)_2
4. Irrigación final con clorhexidina si se va a obturar.
5. Secar el Sistema de Conductos Radicular con puntas de papel.

6. RESISTENCIA DEL BIOFILM FRENTE A ANTIMICROBIANOS

Esta cualidad puede deberse a que:

1. Los antimicrobianos van a llegar en menores concentraciones (concentraciones no efectivas frente a las bacterias) a las zonas más profundas del biofilm. (93,94)
 2. Las bacterias al ser atacadas con dosis subletales tienen capacidad para desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos.
 3. Al crecer en forma sésil, las bacterias activan genes que proporcionan mayor resistencia frente a los antimicrobianos en comparación con las formas planctónicas.
 4. En zonas profundas del biofilm que tienen un menor aporte de nutrientes, las bacterias estarían en una fase inactiva o inmóvil de crecimiento, que es un estado bacteriano no susceptible a los antimicrobianos. (95)
 5. Las bacterias estarían protegidas por la matriz de exopolisacáridos frente a los antimicrobianos. (96). La matriz de exopolisacáridos puede actuar como una barrera retardando la difusión del antimicrobiano lo que disminuye la concentración del antibiótico que ingresa al biofilm, para que en su interior enzimas semejantes a las *lactamasas* lo destruyan, logrando así una resistencia efectiva. (97)
1. (Los microorganismos dentro del biofilm experimentan heterogeneidad metabólica. 98). Es decir, con respecto a la fase de crecimiento. Las zonas de no crecimiento del biofilm están bien posicionadas y contribuye a su supervivencia después del ataque del antibiótico.
 2. Cambios fenotípicos en las células como resultado de la adquisición de genes de resistencia dentro del biofilm. (99)

6.1 El papel del biofilm en la infección.

Puede afectar adversamente la opsonización y la fagocitosis al inhibir la quimiotaxis, e induce la degradación e inhibe las actividades metabólicas

dependientes de oxígeno de los leucocitos PMN, conduciendo a la muerte intracelular. (100,101)

Opsonización:

Preparar la bacteria para ser fagocitada. Consiste en el recubrimiento de los gérmenes con sustancias como las inmunoglobulinas y el complemento, que se unen a los receptores membranales de los PMN, incrementando su capacidad fagocítica. (Fig. 20)

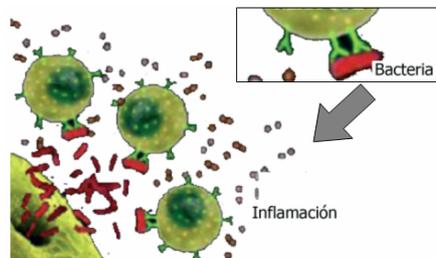


Fig. 20

SIQUEIRA J.F, BornettF. Inteerappointment pain mechanisms diagnosis and treatment endodontic topis 93-109 2004

Quimiotaxis:

Es el proceso mediado por moléculas que induce un movimiento unidireccional en los LPMN, permitiendo su adherencia a las células endoteliales.

6.2 Biofilm bucal en la era de la biología molecular.

Actualmente y gracias a las técnicas de la biología molecular se han empezado a conocer a través de estudios sistemáticos parte de la flora oral.

Un sistema comercial que se fundamenta en la PCR múltiple (técnica de ampliación genómica), seguida de hibridación reversa para detectar las cinco especies reconocidas como periodontopatógenas.

Hasta ahora se considera que la mayoría de las especies bacterianas implicadas en las diversas formas de periodontitis son *saprófitos* (microorganismos especialmente bacterias que viven a expensas de la materia orgánica descompuesta y no en el organismo). Y estos son comunes de la cavidad bucal, que solo expresan su capacidad patógena en huéspedes genéticamente susceptibles y/o cuando se producen circunstancias de riesgo. Dentro de esas especies consideradas “marcadores de periodontitis” se han establecido tres categorías: las muy patógenas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus*, las patógenas: *Prevotella intermedia* y *Treponema denticola*, estas cinco especies son las que detecta el sistema microDent. (Diagnóstico de periodontopatógenos). (102)

Finalmente se citan hasta cinco especies más que potencialmente pueden estar implicadas, si se encuentran en una alta concentración.

Técnica de hibridación reversa.

La detección de algunas especies periodontopatógenas se realiza mediante hibridación (unión) entre un trozo de ácido nucleico del microorganismo a detectar que se le llama (diana) y un oligonucleótido (oligo-poco) nucleótido (producto de hidrólisis del ácido nucleico) hidrólisis descomposición química de un compuesto por acción del agua en productos más simples. Este oligonucleótido es sintético (cadena de ADN de sólo varios nucleótidos) con una secuencia de bases complementarias a la diana.

A este oligonucleótido complementario de la diana se le denomina sonda. Para saber si existe un determinado microorganismo en una muestra de un paciente, se coloca ésta en contacto con la sonda y de existir ese microorganismo buscado, se producirá (unión), hibridación entre la sonda y la diana.

La *genómica* proporciona la secuencia en un ADN, los elementos reguladores y la expresión de un gen.

La *proteómica* fue acuñada por Marc Wilkins para describir a todas las proteínas expresadas por un genoma.

El *proteoma* es el que más se utiliza en el estudio comparativo de dichas proteínas en diferentes condiciones fisiológicas, lo que ofrece una visión de los cambios fenotípicos que sufre un microorganismo en función de las circunstancias que los rodean.

Conclusiones:

1. El biofilm bucal es el agente etiológico principal de la caries y la enfermedad periodontal las bacterias se organizan en la cavidad oral en forma de biofilm.
2. Las bacterias en los biofilm presentan mayor resistencia frente a los antimicrobianos.
3. Esta resistencia se fundamenta a la acción protectora de la matriz y la expresión de su fenotipo.
4. Se pueden realizar cambios en las características físicas y/o químicas de las superficies a las que se adhieren.
5. Para que los antimicrobianos consigan mayor efecto debe realizarse una deestructuración previa del biofilm (cepillado, uso del hilo dental, profilaxis, raspado y alisado radicular). Los estudios muestran que los colutorios con clorhexidina son efectivas por su acción bactericida sobre el biofilm, y depende de la formulación que presenten.

6. Para eliminar el biofilm del sistema de conducto radicular es necesario la preparación biomecánica, limpieza y desinfección estableciendo un protocolo de irrigación. *Hipoclorito de sodio, EDTA, Clorhexidina y Hidróxido de calcio.*

7. La aplicación de métodos moleculares al conocimiento del biofilm bucal dirigidos a la identificación de genes necesarios para la formación del biofilm, así como la búsqueda de enzimas capaces de degradar a la matriz polisacárida, métodos físicos/químicos. Deben ser considerados como fuente para establecer tratamientos específicos para las diversas especies y combatir mejor las infecciones producidas por el biofilm bucal.

BIBLIOGRAFIA

1. SERRANO, Granger Jorge Herrera David. *Dental Plaqué as a Biofilm how to eliminate it* RCOE. Vol. 10, 4, jul. ago. 2005
2. KOLTER, *Microbiology aspects of dental plaque and dental caries. Dent. Clin. AN.Am.* 19. 43:599 614
3. COSTERTON, Zlewaddoski Cadwell. *Microbiology Ann Rev. Microbial* 49. 711-43. 1995
4. ESTRELA, *Ciencia Endodóntica*, Edición 1era. Editorial Artes Medicas. 2005.
5. JUNQUEIRA, Carneiro Edición 3era. Editorial. La Prensa Medica Mexicana. 1990.
6. ESTRELA, *Ciencia Endodóntica*, Edición. 1era. Editorial Artes Médicas 2005.
7. LINCH, J.M., POOLE, N.J. *Microbial Ecology A. Conceptual Approach*. Oxford, Black Scienitic Publications.
8. LINDHE, *Periodontología Clínica*. Edición 2a Editorial Medica Panamericana. 1986.
9. MACNABB y Tomasi, *Host defense mechanisms at mucosal surfaces Annual Review of Microbiology*. 35: 477-496. 1981.
10. GIBBONS, Van Houte, *Bacterial adherence in oral Microbial Ecology Annual Review of Microbiology*. 29: 19-44. 1975.
11. MARSH, P. *Oral Microbiology* Walton, on Thomas: Thomas Nelson & Sens 1980.
12. *Beachy Bacterial adherence; Adhesin-receptor interaction to mucosal surfaces. Journal of infection diseases*. 143:325-345.
13. LIE, T. *Morphologic studies on dental plaque formation a Acta Odontologica Scandinavica* 37: 73-85. 1979,
14. MANDELSTAM J. Mc Quillen *Biochemistry of Bacterial Growth*. Oxford; Blackwell Scientific Publications 1980.
15. LOESCHE, Syed. *The Bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis* Journal of Periodontology 53: 223-230. 1982.
16. LINDHE, *Periodontología Clínica* Edición 1a. Editorial Medica Panamericana. 1986.
17. ESTRELA, C. *ciencia Endodóntica* Edición. 1ª Editorial artes Medicas Latinoamérica 2005.
18. PEÑA, Arroyo *Bioquímica* Edición. 4ª Editorial Limusa. 2000.
19. BURNETT, G. *Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca* Edición. 5ª Editorial Limusa 1998.
20. BURNETT, G. *Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca* Edición. 5ª Editorial Limusa 1998.
21. MORRIS, J.G. *Nature of oxygen toxicity in anaerobic microorganisms. In Strategies of Microbial life in extreme Environments, ed. Shilo, M. pp.149-162 Weinheim: Verlag Chemie.*
22. GLOBERMAN, D.Y. & Kleinberg I. *Intraoral PO2 and its relation to bacterial accumulation on the oral tissues In saliva and Dental caries* ed Kleinberg I. Ellison S:A:& Mandel I.D: pp. 275-291. Washington D. C. Information Retrieval.

23. ROOT R.K, *The microbicidal mechanisms of human neutrophil and eosinophils* Reviews of infectious 3: 565-598. 1981.
24. FANTONE, J.C. *Role of oxygen free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reactions* American Journal of Pathology 107: 397- 418 1982.
25. WALTON, *Principios y Practica clínica*. Edición. 1ª Editorial Interamericana 1990.
26. FRABRICIUS, L. Moller *Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals alter various times of closure*. Scand J. Dent Res 90: 134. 1982.
27. ESTRELA, *Ciencia Endodontica*. Edición. 1ª Editorial Artes Medicas latinoamericana. 162. 2005.
28. BURETT, G. *Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca* Edición 5ta. Editorial Limusa. 380. 1998.
29. LOSA, Penadés Leiva *Biofilm bacterianos e infección*. Departamento de Química y Biología Molecular.
- 29 BRANDA, S.S. Vik, FRIEDMAN, L. KOLTER, R. *Biofilm the matrix revisited* Trends Microbial 13: 20-26 2005.
30. BURNETT, G. *Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca* . Edición 5ª Editorial Limusa 323. 1998.
31. SUTHERLAND, I. *Biofilm exopolysaccharides a strong and aticky framework* Microbiology 147: 3-9. 2001.
32. COSTERTON, Lewandowski Z. CADWELL, D.E. KORBER, D.R. Lappin SCOTT H.M. *Microbial biofilm Annu Rev Microbial* 49: 711-745. 1995.
33. DAVEY M.E. O'Toole G.A. *Microbial biofilm from ecology to molecular genetics* Microbial Mol. Biol. Rev. 64:847-867. 2000.
34. STTODLEY P. Saver K. Davies D.G. COSTERTON, J.W. *Biofilm as complex differentiated communities Ann. Microbial* 56: 187-209. 2002.
35. KIM, L. *Riddle of Biofilm Resistance Antimicrobial Agents. And chemotherapy*. 99-1007. 2001.
36. *Biofilm and Planktonic Cell of Pseudomonas eurugynosa have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials* Journal Bacteriology Vol. 183. No. 23. 2001.
37. GARCIA, B. Latasa C. SOLANO C. Portillo F.G. Gamazo C. I *Role of the protein family in salmonella cellulose biosynthesis and biofilm formation*.
38. DONLAN, Costerton J.W. *Biofilm Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganism. Clinical Microbiology Review* 167-93. 2000.
39. SOCRANSKY, S.S. Haffajee A. D. *Biofilm dentales; objetivos terapéuticas difíciles Periodontal* 3: 12-55 2000.
40. MARSH, PD *Physiological approaches to the control of oral biofilm* Adv Dent Res 11: 176-85 1997.
41. XU K.D. *Biofilm resistance to antimicrobial agents. Microbiology* 146: 9. 2000, 2004.
42. FINE, DH Furgang D. Barnett M.L. *Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic Planktonic and biofilm forms of Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Journal Clin. Periodontal 28-697. 2001.
43. COSTERTON, J.W. *Biofilm the customized microniche* J Bacteriology.
44. SOCRANSKY, S.S. HAFFAJEE, A. D. *Biofilm dentales objetivos terapéuticos difíciles Periodont*. 8: 12-55. 2000, 2003.

45. RUSSELL, M.W. *Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci* Car Res 53: 4-15. 1999.
46. *Microorganismos de la placa dental relacionadas con la etiología de la periodontitis*. Guillarte Acta Odontológica venoz v. 42. No. 3 Caracas set. 2004.
47. *Microorganismos de la placa dental relacionadas con la etiología de la periodontitis*. Guillarte Acta Odontológica venoz Caracas set. 2004
48. BERNIMOULIN, J. P. *Conceptos recientes sobre formación de placa* Journal Clin. Periodontal 30: 7-9. 2003.
49. PEREA, J. *La flora de la boca en la era de la biología molecular* Med. Oral Pato. Oral Cir. Bucal 9: 51-10. 2004
50. John G. Thomas M.S. *Managing the complexity a dynamic biofilm*, JADA v. 137 November 2006
51. *Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis* Guillarte C. Acta Odontologica. Venezuela. v. 42 No. 3 Caracas set. 2004.
52. *Managing the complexity et a dynamic biofilm* Thomas Lindsay Jada, v. 137 November 2006.
53. LINDHE, *Periodontología Clínica* Edición 1a Editorial Medica Panamericana 1986.
54. THAILADE, I. Wright W.H. Jensen & Loe H. *A longitudinal clinical and bacteriological investigation* Journal of Periodontal Research 1: 1-13.
55. SLOTS, J. Moenbo D. Langebaek J.& Frandsen A. (1978) *Microbiota of gingivitis in man Scandinavian*. Journal of Dental Research 86: 174-181.
56. SOCRANSKY, S.S. Manganiollo A. D. J. (1977), *Bacteriological studies of developing supra gingival dental plaque*, Journal of Periodontal Research 12; 90-106.
57. WILLIAMS, A.J. & PANTOLANE, R.M. & SHERRIS, 1976 *Subgingival microflora and periodontitis* Journal of Periodontal Research. 11: 1-18.
58. SLOTS, J. (1979) *Subgingival microflora and periodontal disease*. Journal of Clinical Periodontology 6: 351-382.
59. LINDHE, J. & RYLANDER H. (1975) *Experimental gingivitis in young dogs Scandinavian* Journal of Dental Research. 83: 314-326.
60. COSTERTON, JW Lewandowski, Z, Caldwell, DE, Korber, DR, Lappin, Scott HM *Microbial biofilms*. Annu Rev. Microbial 49: 711-45. 1995.
61. LISTGARTEN M.A. *Formation of dental plaque and other oral biofilm* En: Newman H.N. Wilson, M. eds *dental plaque revisited oral biofilms health and disease Uk: Biolne*; 187-210. 1999.
62. RUDNEY J.D. *Saliva and dental plaque* .Adv Dent Res 14: 29-39 . 2000.
63. PEREZ A. *La biopelícula una nueva visión de la placa dental*. Rev. Estomatol Herediana 15: (1) 82-85. 2005.
64. SOCRANSKY, S.S. Haffajee A.D. *biofilm dentales: objetivos terapéuticos difíciles*. Periodontol 3: 12-55. 2000, 2003.
65. MARSH, P.D. *Are dental diseases examples of ecological catastrophes? S.G.M. Special Lectura*. Microbiology. 149: 279-94. 2003.
66. MARSH, P.D. Bradshaw, D.J. *Physiological approaches to the control of oral biofilm* Adv. Dent. Res 11: (1) 176-85. 1997.
67. BAEHNI, P. C. Takeuchi V. *Anti- plaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases*. Oral Diseases (suppl) 23-9. 2003.

68. HANHAN, A. Addy M. *The effect of chewing sugar- free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces* J. Clin. Periodontol. 28: 255-7. 2001.
69. QUIRYNEN, M. Bollen C.M. *The influence of surface roughness and surface free energy on supra and subgingival plaque formation in man A review of the literature* Journal Periodontol 22: 1-14. 1995.
70. DAHLEN, G. *The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease* Journal Clin. Periodontol. 19: 802-9. 1992.
71. STANLEY, PM *Factors affecting the irreversible attachment of pseudomonas aeruginosa to stainless can* J. Microbiol. 29: 1|493-9. 1983.
72. BAEHNI, AS *Detachment of linking film bacteria from enamel surface by rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm ad.* Dent Res 11: 528-38. 2004.
73. BEMINOULIN, J. P. *Conceptos recientes sobre formación de la placa* Journal Clin Periodontol 30: 7-9. 2003.
74. FINE, DH Furgang, D. Barnett, M. L. *Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against Planktonic and biofilm form of actinobacillus actionomycetemcomitans* Journal Clin. Periodontol. 28: 697-700. 2001.
75. ARWEILER, NB *Efficacy of an amine fluoridetriclosan mouthrinse as compared to the individual active ingredients* Journal Clin. Periodontol. 30: 192-6. 2003.
76. ARWEILER, NB *Alcohol free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality A controlled clinical study* Journal Clin. Periodontol 28: 168-74. 2001.
77. PAN, P. *Determination of the in situ bactericidal of an essential oil mouthrinse using a vital st air method* Journal Clin. Pereiodontol. 27: 256-61. 2000.
78. OUHAYON, JP *Penetrating the plaque biofilm impact of essential oil mouthwash* Journal Clin. Periodontol. 2004.
79. NETUSCHIL, L. *Plaque bacteria counts and vitality during clorhexidine meridol and listerine mouthrinses* Eur. Journal oral science 103: 355-61. 2004.
80. THEILADE, E. Wright, W.H. Jensen, S.B. & Loe, H. (1966). *Experimental gingivitis in man II A longitudinal clinical and bacteriological investigation* Journal of Periodontal Research 1: 1-13.
81. KAKEHASHI, S. Stanley, H. Fitzgerald R. *The effects of surgical exposuies of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats.* Oral surg. Oral Med. Oral Pathol. 20: 340-9. 1965.
82. MOLLER, A. F abricius, L. Dahlen G. Ohman, A. Heyden, G. *Influence on periapical lesions* Endod. Dent. Traumatol. 7: (5) 226-9. 1991.
83. SUNDQUIST, G. *Ecology of the root canal flora* Journal Endod. 18: (9) 427-30. 1992.
84. MOLLER A. (1981) *En Farber, P. Seltzer, S. Endodontic Microbiology I etiology* Journal Endod. 14: (7) 363-71. 1988.
85. KAKEHASHI, S. (1965) *En Or stavik, T. Pitt, Ford. Essential endodontology prevention and treatment of apical periodontitis* Ed. Blackwell science 1998.
86. COHEN, S. Burns, R.C. *Vias de la pulpa* 8a Edición, Editorial Elsevier Science Madrid. 493-497. 2002.
87. WALTON, R. E. Tarabinejad m. *Endodoncia Principios y Practica* 2a. Edición, Editorial McGraw –Hill México. 298-301. 1996.
88. SUNDQUIST, G. Eckerbom M.L. Larsson A.P. Stogren, *Dental pulps to induce purulent infection* Infec. Immun. 25: 685-693. 1979.

89. ESTRELA, C. *Ciencia Endodóntica* 1a. Edición, Editorial Artes Medicas latinoamericana 2005.
90. *Biofilm formation in medicated root canals*, Distel DMD MS Hatton *Journal of endodontics* v. 28. No. 10 october 2002.
91. INGLE, J.I. Bakland LK *Endodoncia* 5a Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, México. 4-67. 2004.
92. ZABNDER, M. *Root canal irrigants* *Journal Endodon.* 28:389-396. 2006.
93. DANLAN, Costerton J.W. *Biofilm Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms* *Clinical Microbiology Reviews.* 167-93. 2002.
94. SOCRANSKY S.S. Haffajee AD *Biofilm dentales objetivos terapéuticos difíciles* *periodontal* 3: 12-55. 2000. 2003.
95. XU, K.D *Biofilm resistance to antimicrobial agent.* *Microbiology.* 146: 547-9. 2000, 2004.
96. FINE D.H. Furgang D. Barnett M.L. *Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic Planktonic and biofilm forms of actinobacillus actinomycetemcomitans* *journal Clin. Periodontal* 28: 697-700. 2001.
97. DUNNE, W.M. Mason, E.O. Kaplan, *Diffusion of ritampin and vancomycin through a staphylococcus epidermis biofilm.*
98. VENGLARCIK, J. S. Blair L. L. Dunkle, J. M. *pH dependent oxacilin tolerance of staphylococcus aureus* *Antimicrob. Agents. Chemother* 23 : 232-3. 1983.
99. DAREY, M.E.G.A. *Microbial Biofilm From ecology to molecular genetics microbiology and molecular biology reviews* 64: (4) 1092-2172. 2000.
- 100 PIER, G. *Pseudomonas aeruginosa : a key problem in cystic fibrosis* *MASM news* 64:339-47.
- 101 BROOKS, W. Demuth, D.R. Gil, S. Lamont R.J. *Identification of a streptococcus gordinii SSB domain that mediates adhesion to porhyromonas gingivalis* *Infect. Immun..* 65: 3753-3758. 1997.