



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ENSAYO DE ADHERENCIA IN VITRO DE  
*Streptococcus mutans* SOBRE SUPERFICIE DE  
POLIMETILMETACRILATO.

T E S I S

QUE PRESENTA  
MARIA DE LOURDES RUIZ GUERRERO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE  
CIRUJANA DENTISTA

DIRECTOR: C.D. LUIS OCTAVIO SANCHEZ VARGAS

ASESORAS: M.C. SILVIA ANTUNA BIZARRO.

D EN C TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES.

V.O.B.O  
  
26-Ene-05



MÉXICO, D.F.

2005

m340660



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.

Entregado a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a través de correo electrónico e impreso el contenido de mi trabajo investigativo  
NOMBRE: Marta de Lourdes Ruiz Gato c.v.o  
FECHA: 29 de mayo de 2018  
FIRMA: [Firma]

## **AGRADECIMIENTOS.**

Como agradecimiento a tú aliento, ánimos, apoyo, fe, compañía, fuerza de seguir adelante a tí mi **DIOS**.

No tengo con que agradecer, desde la vida, sus palabras de aliento, su cariño, su amor, el apoyo que siempre me han dado, esos consejos, el gran sacrificio que hicieron, todos sus desvelos por estar conmigo, a ustedes mi gran amor y admiración mis maravillosos padres.

## **RAÚL Y LULÚ.**

**Rulo y Lupis** los amo, porque en todo me han apoyado, saben ustedes como anhelaba este momento, gracias a mis extraordinarios amigos y hermanos por estar siempre conmigo en los momentos que he caído y en los momentos de gloria.

Mi agradecimiento especial a mis abuelitos **Catalina, Gloria, Jacobo** por sus oraciones, las porras de todos los días, el cariño, que nunca me di por vencida.

**Los quiero mucho.**

Gracias al apoyo de mis **Tíos, Primos** por no perder la confianza en mí por escucharme y estar conmigo.

Como olvidar a mis grandes amigos que han vivido conmigo momentos de tristezas, logros, adversidades a ustedes; **Paola, Isabel, Andrea, Karina, Alberto, Seidy, Miguel, Alejandro, Paola C.**

Un gran reconocimiento a mis **Pacientes** que sin ellos no hubiera aprendido tantas cosas, por su confianza y paciencia.

Gracias por sus conocimientos, por su ética y profesionalismo a mis profesores de toda mi educación en especial a los de la Universidad al: **C.D Pedro Palma, C.D Gustavo Montes de Oca, Mtro. Víctor Moreno, Mtra. Beatriz Aldape, C.D Jesús Rubalcava**, por creer en mí como alumna, persona y profesionista.

Mi cariño a unas personas grandiosas que me enseñaron mucho y que hoy por hoy el aprecio es mutuo **M.C Silvia Antuna, C.D Angélica Castillo y Azucena.**

A usted **Dr. Cesar Montalvo** porque creyó en mi proyecto, en mis ganas de trabajar y aportar algo a la investigación Gracias.

Gran amiga **Dra. Ma. del Pilar Somohano** por sus consejos, apoyo, sus ánimos por toda su ayuda mil gracias.

**Yezy**, te quiero mucho, gracias por tu cariño, confianza y ánimos.

Agradezco al **Sr. Francisco Pasos Nájera** por la realización fotográfica del estudio de Microscopía Electrónica.

De manera especial al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM que me abrió las puertas para poder hacer ahí mi proyecto, por la experiencia de poder presentar mi trabajo en un seminario **D en C. Teresa Fortoul van der Goes**. Gracias

Mi mayor agradecimiento al **AMOR** que me ha enseñado a vivir con intensidad, creyendo en mí por lo que soy y por lo que valgo.

**GRACIAS.**

***“Ser hombre es comprender que la vida no es algo que se nos da ya  
hecho, sino la oportunidad para hacer algo bien hecho”***  
**MIGUEL ÁNGEL CORNEJO.**

**Esta tesis ha sido revisada y cuenta con la participación de colaboradores de la Facultad de Medicina y Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradeciendo su interés por esta investigación a:**

**M.C. Silvia Antuna Bizarro.**

**Asesora de la Microscopía Electrónica de Barrido.**

**D en C. Teresa Fortoul van der Goes.**

**Jefa del Departamento de Biología Celular y Tisular.**

**Biol. Armando Zepeda Rodríguez.**

**Colaborador en la Microscopía Electrónica de Barrido.**

**Facultad de Medicina.**

**Q.F.B. Fernando Franco Martínez.**

**Jefe de la Asignatura de Microbiología de la Facultad de Odontología, Director y Colaborador de la Primera Fase de la Investigación.**

**Mtro. José Arturo Fernández Pedrero.**

**Coordinador Extensión Universitaria y Educación Continua, y Responsable de la Línea de Investigación.**

**Mtro. Enrique Ríos Szalay.**

**Coordinador del Diplomado de Prótesis.**

**C.D. Eduardo Medina García.**

**Profesor del Departamento de Prótesis Bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación.**

**Profesor de Prótesis Bucal Fija y Removible de Nivel Licenciatura.**

**Facultad de Odontología.**

# INDICE.

<b>RESUMEN</b>	10
<b>INTRODUCCION</b>	11
<b>MARCO TEORICO</b>	14
<b><i>Streptococcus</i></b>	14
Características generales	17
Morfología	18
Clasificación	19
Estructura antigénica	22
Factores de patogenicidad	24
<i>Streptococcus viridans</i>	25
<i>Streptococcus mutans</i>	26
<b>Biopelículas y adherencia bacteriana en la cavidad bucal</b>	30
Biopelícula supragingival	34
Biopelícula subgingival	34
<b>Adherencia bacteriana e implicaciones odontológicas</b>	36
Adhesión bacteriana	36
Mecanismo de adherencia	36
<b>Primera fase: Transporte a la superficie</b>	37
<b>Segunda fase: Adhesión inicial</b>	37
<b>Tercera fase: Adhesión específica</b>	38
Adhesinas	38
Receptores	38
Adhesión por ácido lipoteicoico	39
Adhesión por unión lectina-polisacárido	39
Adhesión por unión proteína-proteína	40
Adhesión por polisacáridos extracelulares	40

<b>Cuarta fase: Colonización</b>	40
<b>Adherencia de <i>Streptococcus mutans</i></b>	41
<b>Adherencia sobre materiales dentales</b>	43
Características del Polimetilmetacrilato	47
<b>Técnicas para el estudio de biopelículas</b>	50
Microscopio electrónico de reflexión o <i>Scanning</i>	50
Estudio de biopelículas	53
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION</b>	55
<b>HIPÓTESIS</b>	56
Hipótesis de trabajo	56
<b>OBJETIVOS</b>	56
Objetivo general	56
Objetivos específicos	56
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	57
Preparación de especímenes	57
Microbiología	57
Preparación del inóculo	58
Ensayo de adherencia	59
Observación de la superficie del polimetilmetacrilato con Microscopía Electrónica de Barrido	60

Muestras analizadas	60
Tipo de muestra	60
Tamaño de la muestra	60
<b>RESULTADOS</b>	61
Ensayo de adhesión a 24 y 48 hrs	61
Análisis por Microscopía electrónica de barrido (MEB)	61
<b>DISCUSIÓN</b>	67
<b>CONCLUSIONES</b>	71
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	73

## **RESUMEN**

En la cavidad bucal hay una población microbiana muy diversa. Esta se afecta por numerosos cambios durante la vida. Entre los cuales están los estreptococos.

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, que tiene la capacidad de adherirse a diferentes superficies inertes y tejidos duros, es uno de los modelos de adhesión y coagregación bacteriana que forma biopelículas dentales y en materiales plásticos.

Durante la pérdida de los dientes o en su rehabilitación, los microorganismos se adhieren y reproducen a una superficie, las mas usadas son las prótesis bucales.

El material más utilizado para esas prótesis es el polimetilmetacrilato (PMMA) que se utiliza para provisionales, prótesis fija, removible, prostodoncia y ortodoncia. Las características de este material favorecen la adhesión bacteriana, que es un requisito para la colonización.

El objetivo de este trabajo es el de la adherencia *in vitro* de *S. mutans* sobre superficies de PMMA a diferentes periodos de tiempo con la ayuda de Microscopía electrónica de barrido (MEB), donde se obtuvo una diferencia notable entre las 24 y 48 hrs. A las 48hrs la cantidad de bacterias fue mayor ( $p < 0.05$ ) que en los otros tiempos de incubación manejados en este estudio. Se puede concluir que conforme aumentó el tiempo, hubo mayor cantidad y mayor colonización por *S. mutans*. La adhesión y colonización de este puede ocurrir en superficies de materiales de restauración, por lo que se recomienda una buena información de higiene para así evitar la enfermedad periodontal.

## **INTRODUCCIÓN.**

La cavidad bucal se ve afectada por numerosos cambios durante la vida y los microorganismos que en ella habitan como microbiota habitual, se modifican de manera constante dependiendo de múltiples factores que se presentan durante el crecimiento y madurez del individuo (Dorey, 1985).

La cavidad bucal contiene una de las poblaciones microbianas más variadas y concentradas de todo el cuerpo humano. Se considera que la adquisición de la flora microbiana bucal se genera al momento del nacimiento, cuando se atraviesa el canal vaginal. A las pocas horas del nacimiento o inmediatamente después de él ya se encuentran microorganismos como: estreptococos del grupo viridans, estafilococos, neumococos, coliformes, lactobacilos, *Neisserias sp.* y *Candida albicans*, entre otros. Las modificaciones en la microflora bucal, se llevan a cabo cuando ocurren los cambios propios de las estructuras bucales, ésta microflora se modifica primordialmente a partir de la erupción dental y de los cambios en la dieta.

Los estreptococos constituyen un amplio grupo de bacterias, formado por 21 especies y diversos serotipos; algunos de ellos forman parte de la microbiota habitual, sin que se haya demostrado su patogenicidad. Mientras que otros se comportan como saprófitos, comensales o como patógenos importantes, que producen diversas infecciones en el hombre (Branting, 1990).

Uno de los estreptococos patógenos responsables de infección bucal es el *Streptococcus mutans*.

El *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, presenta una temperatura óptima de desarrollo de 36°C (Verran, 1997, Samarayanake, 1994).

*S. mutans* posee la capacidad de adherirse a diferentes superficies, mediante elementos bacterianos denominados adhesinas, cuya función es fijar al microorganismo a tejidos duros o superficies inertes, a materiales artificiales y a otras bacterias (Verran, 1997, Nikawa, 1997).

Conforme los dientes se pierden o se rehabilitan, los sitios disponibles para la colonización microbiana van cambiando y los microorganismos requieren nuevas superficies a las que se adhieren para después reproducirse, y son las prótesis, que sustituyen o rehabilitan a los dientes, las que proporcionan un medio protegido del arrastre salival, en el cual las bacterias y los hongos pueden multiplicarse y colonizar tanto a la mucosa bucal como a la superficie acrílica de la prótesis dental elaborada con ese material (Verran, 1997, Nikawa, 1997).

Estas prótesis son fabricadas con diversos materiales, uno de ellos es la resina acrílica, material universal, que ofrece una superficie sólida (Nikawa, 1999, Tuomas, 1999). Sin embargo, esta superficie puede presentar defectos, lo cual, aunado a otros factores locales, contribuyen significativamente en la adhesión de microorganismos como los *Streptococci*, involucrados en procesos infecciosos importantes de la cavidad bucal (Dorey, 1985, Radford, 1999, Nikawa, 1997, Waltimo, 1999, Samaranayanake, 1986).

Otros estudios mencionan que la interacción entre materiales para restauración y la formación de la placa bacteriana no se ha estudiado completamente, sin embargo se ha demostrado que las superficies rugosas de los materiales pueden incrementar la adhesión (Shanal, 1998) Un material de restauración muy utilizado es el **polimetilmetacrilato autopolimerizable (PMMA)**.

El polimetilmetacrilato autopolimerizable se utiliza como material de soporte, para fabricar provisionales, prótesis parcial, fija y removible. También se utiliza para sustituir dientes, en aparatos de ortodoncia y ortopedia, prostodoncia total.

Uno de los problemas en la rehabilitación bucal es el evitar que las prótesis o los materiales con los cuales se elaboran éstas, permitan la adherencia bacteriana causante de lesiones cariosas y también a patologías periodontales.

Es de suma importancia evaluar los materiales de resina acrílica (PMMA), que se emplean para rehabilitación protésica y determinar su calidad a través de la adherencia que tienen sobre este, bacterias patógenas como lo es el *S. mutans*.

Por lo que el propósito de éste trabajo fue determinar la adherencia *in vitro* del *S. mutans* en especímenes de PMMA y demostrar la formación de biopelículas en diferentes intervalos de tiempo de inoculación utilizando la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) como herramienta de estudio.

# **MARCO TEORICO**

## ***Streptococcus.***

*Streptococcus mutans* posee una elevada capacidad de adherencia a superficies inertes y tejidos duros, representa uno de los modelos de adhesión y coagregación bacteriana más complejos en la formación de biopelículas dentales y en materiales plásticos.

Los miembros del género *Streptococcus* tienen una historia interesante, y son la causa de las enfermedades más difundidas y de mayor morbilidad en los seres humanos en todos los tiempos, más que casi ningún otro grupo de bacterias, con la posible excepción del bacilo tuberculoso. En 1835, Richard Bright reconoció la relación entre la escarlatina, la glomerulonefritis y la insuficiencia renal crónica (enfermedad de Bright). Pasteur, Robert Koch y Neisser mientras trabajaban para establecer la teoría bacteriana de la enfermedad, reconocieron al estreptococo como agente causal de la sepsis puerperal. El cirujano Frederick Fehleisen reconoció que un colega, Alexander Ogston, definió el papel de los estreptococos en las infecciones de las heridas posquirúrgicas. En 1932, Coburn estableció la relación entre el estreptococo y la fiebre reumática.

El estudio de laboratorio de los estreptococos fue posible por la introducción de medios de cultivo sólidos hacia el fin del siglo XIX. A principios del siglo XX, Hugo Schottmuller había demostrado la reacción hemolítica producida por ciertos estreptococos en agar sangre. Unos años después, J.H.Brown, trabajando en el Instituto Rockefeller, describió por primera vez las diferentes reacciones hemolíticas de los estreptococos, a las que se denominó alfa, beta y gamma.

A principios de la década de los 30s, Rebecca Lancefield identificó cinco grupos antigénicos característicos de estreptococos, a los que denominó A, B, C, D y E, sobre la base de las diferencias serológicas en los carbohidratos de la pared celular. Desde esa época, la investigación y estudios continuos han ampliado el

número de grupos serológicos de los 18 reconocidos hasta ahora y clasificándolos de A a H y de K a T. en la mayor parte de los laboratorios clínicos de rutina, sólo se identifican los grupos A, B y D, como responsables de la mayoría de las infecciones humanas. Debe notarse que los recientes estudios de hibridación de DNA-rRNA muestran que los estreptococos del grupo D, enterococos y no enterococos pertenecen a diferentes géneros.

El género de *Streptococcus* significa "moras flexibles". La taxonomía de las especies de *Streptococcus* ha sido sometida a muchas revisiones y seguida de diversos estudios genéticos y quimiotaxonómicos. El género *Streptococcus*, consiste hoy en día de Estreptococo piogeno ( $\beta$ -hemolítico), Estreptococos orales y algunas otras especies vagamente relacionadas.

El Estreptococo piogeno (*S. pyogenes*, *S. equi*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, y *S. iniae*) están cercanamente relacionados. El grupo "oralis" comprende *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius* y *S. pneumoniae* (previamente agrupado con Estreptococos piogénicos). El grupo "mutans" incluye: *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. ferus*, *S. macacae* y *S. downei*. *S. salivarius* no está relacionado con este grupo pero está muy cercanamente relacionado con *S. termophilus* y la especie recientemente descrita *S. vestibularis*. *S. agalactiae* es una especie distinta no relacionada con cualquiera de las otras especies. (Tabla 1)

Dentro del grupo *oralis* los problemas taxonómicos no resueltos incluyen el status de *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius* (a veces llamado grupo *milleri* y grupo *mitis*). Una dificultad adicional ha sido el uso de diferentes nomenclaturas en Europa y América (Slots, 1991).

Algunas especies de Estreptococos colonizan cerdos, caballos y ganado vacuno; cada uno de ellos no están relacionados entre sí ni con otros grupos de especies.

Espece	Serogrupo Lancefield	Hemólisis	Hábitad humano	Enfermedad
<b>Grupo <i>Streptococcus mutans</i></b>				
<i>S. mutans</i>	-	$\alpha, \gamma (\beta)$	Orofaringe, intestino	Caries, placas dentales, endocarditis y otros
<i>S. rattus</i>	-	$\alpha, \gamma$	Orofaringe	Caries, placas dentales.
<i>S. cricetus</i>	-	"	"	"
<i>S. sobrinus</i>	-	"	"	"
<i>S. ferus</i>	-	"	"	-
<i>S. downei</i>	-	"	"	-
<i>S. macacae</i>	-	"	"	-
<b>Grupo <i>Streptococcus oralis</i></b>				
<i>S. sanguis</i>	H, W	$\alpha$	Orofaringe, piel intestino	Placas dentales, endocarditis, infecciones de heridas, abscesos
<i>S. gordonii</i>	H	"	Probablemente orofaringe, piel	Probable patología similar a <i>S. sanguis</i>
<i>S. parasanguis</i>	B, F, G	"	"	"
<i>S. crista</i>	H, K	"	"	"
<i>S. oralis</i>	-	"	"	"
<i>S. mitis</i>	-	"	Orofaringe	Placas dentales, endocarditis
<b>Grupo <i>Streptococcus milleri</i></b>				
<i>S. anginosus</i>	A, C, F, G	$\beta$	Orofaringe, intestino, piel	Placas dentales, endocarditis, diversos abscesos
<i>S. intermedius</i>	-	$\alpha, \gamma$	"	"
<i>S. constellatus</i>	F	$\alpha$	"	"
<b>Grupo <i>Streptococcus salivarius</i></b>				
<i>S. salivarius</i>	K	$\gamma$	Orofaringe, intestino	Placas dentales, endocarditis
<i>S. vestibularis</i>	-	$\alpha$	Orofaringe	"
<b>Otros estreptococos</b>				
<i>S. pyogenes</i>	A	$\beta$	Rinofaringe, piel intestino	Faringitis aguda, erisipela, escarlatina, impétigo, sepsis puerperal, abscesos. Procesos postinfecciosos: fiebre y endocarditis reumática y glomerulonefritis
<i>S. agalactiae</i>	B	$\beta (\alpha \text{ o } \gamma)$	Rinofaringe, vagina, intestino	Sepsis puerperal, endocarditis, neumonías, artritis. Infecciones neonatales: neumonías, meningitis, septicemia.
<i>S. dysgalactiae</i>	C	$\beta$	Rinofaringe, vagina, piel	Infecciones de heridas, sepsis puerperal, endocarditis, celulitis.
<i>S. pneumoniae</i>	-	$\alpha (\beta)$ **	Rinofaringe	Neumonía, septicemias, sinusitis, otitis, meningitis.
<i>S. bovis</i>	D	$\gamma (\alpha)$	Intestino	

Tabla.1 Taxonomía y grupos serológicos de los estreptococos.

## **Características generales**

Los estreptococos son bacterias grampositivas, inmóviles, no esporuladas y carecen de catalasa. Esta característica los diferencia de los estafilococos. El metabolismo es fermentativo, produce ácido láctico, lo que provoca un descenso en el pH y hace que se utilicen medios amortiguadores para evitar su muerte.

Los estreptococos constituyen un amplio grupo formado por 21 especies y diversos serotipos; algunos de ellos forman parte de la microbiota habitual, sin que se haya demostrado su patogenicidad, mientras que otros se comportan como saprófitos, comensales o importantes patógenos que producen diversas infecciones en el hombre (Voet, 1990).

Su crecimiento se da en medios enriquecidos con sangre y líquidos tisulares formando en medios sólidos colonias redondas, convexas y pequeñas de 1.5 a 2mm de diámetro, la temperatura óptima para su crecimiento es de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , son anaerobios facultativos (Gibbons, 1978, Gibbons, 1988, Kataoka, 1997, Azen, 1981).

Son responsables de reacciones inflamatorias localizadas, abscesos y septicemias. La naturaleza de la lesión depende de la virulencia, la forma en que se introducen, la invasión de tejidos y la resistencia del hospedador, así como también de las enzimas y productos metabólicos elaborados por el microorganismo (Azen, 1981).

En el hombre son causa de enfermedades epidérmicas como escarlatina, endocarditis bacteriana aguda y septicemias. Pueden ser el origen de abscesos, furúnculos, celulitis, amigdalitis, neumonía, meningitis y otitis media (Kataoka, 1997, Azen, 1981, Hay, 1983)

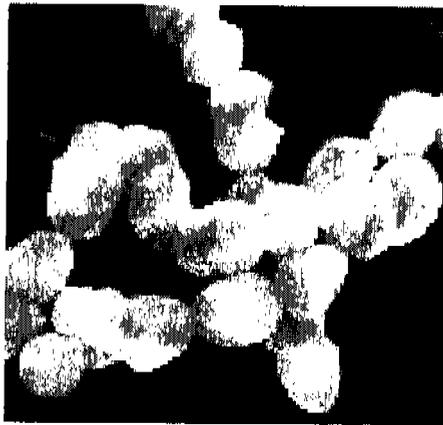


Fig.1 Características del *Streptococcus* 12000X.

### Morfología

Son bacterias esféricas u ovals con un diámetro de entre 0.6 y 1  $\mu\text{m}$ , se presentan típicamente en cadenas largas o cortas de 4 a 6 elementos aunque también se pueden encontrar en parejas. La longitud de las cadenas varía mucho y está condicionada principalmente por factores ambientales (Gibbons, 1988, Hay, 1983).

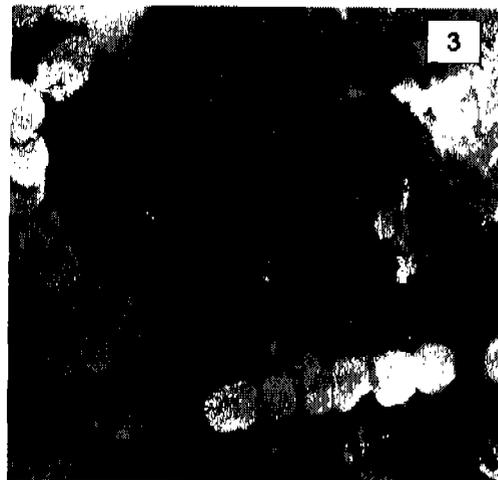
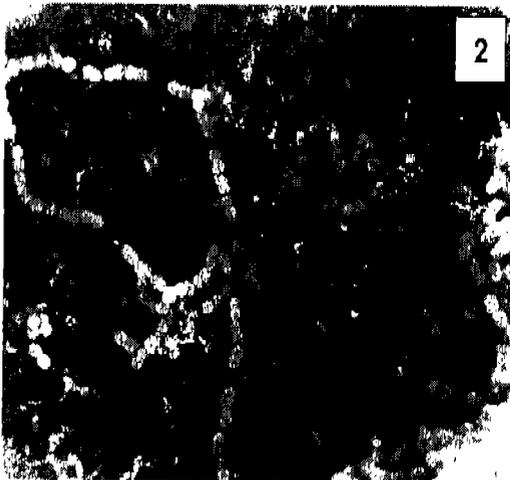


Fig.2, 3. Cultivo de *S. mutans* donde se observa su crecimiento a 3200X.

## Clasificación

Han surgido algunas variaciones con respecto a la clasificación de los estreptococos. Sherman menciona que están divididos en cuatro grupos: el piógeno, el viridans, el enterococcico, y el láctico.

Brown se basa en la lisis del eritrocito en las cajas de agar sangre, divide en un grupo beta hemolítico, un grupo alfa hemolítico de pigmento verde y en un grupo denominado gama o no hemolítico (Gibbons,1980, Gibbons, 1978, Gibbons, 1988, Kataotaka, 1997).

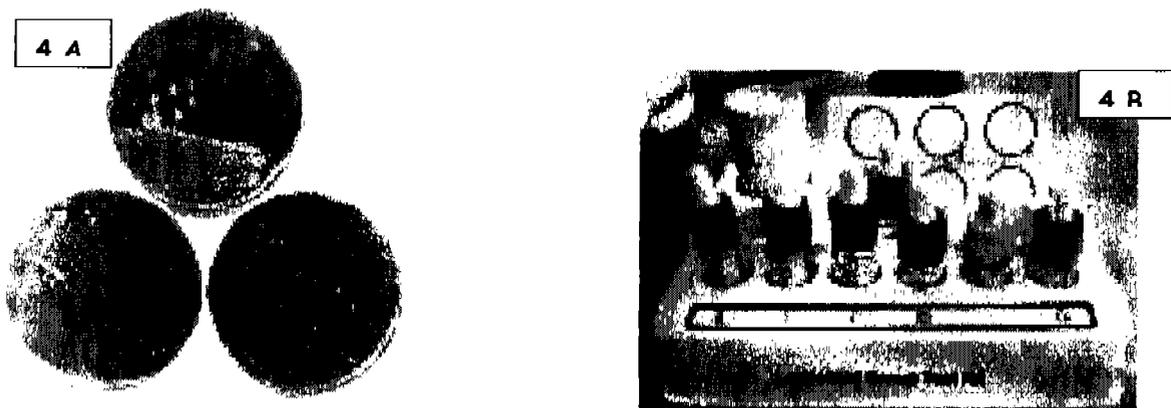


Fig.4A, 4B Representación de la clasificación de Brown y Rebecca Lancefield.

La clasificación más precisa es la de Rebecca Lancefield en la década de los 30s, que se basa primero en la presencia de un antígeno; segundo en un marcador individual y tercero en compuesto de actividad fisiológica, ella extrajo material reactivo serológicamente con ácido hidroclicórico caliente diluido y con técnicas de precipitado menciona que los estreptococos hemolíticos contienen polisacáridos en

la pared celular llamados antígenos C, se diferencian 18 grupos serológicos incluyendo los A a H y de K a T. (Tabla 1)

Los miembros de cada grupo que identifico Rebecca Lancefield poseen a su vez antígenos distintivos adicionales en sus paredes celulares, llamados también "proteínas parietales", que pueden actuar como factores importantes de virulencia del estreptococo (proteína "M"), y los subdividen en diferentes tipos lo cual es útil en estudios epidemiológicos y en la predicción de secuelas de infecciones estreptocócicas agudas (Gibbons, 1980, Kataoka, 1997)

Dentro de los antígenos adicionales encontrados se ha mencionado a la proteína M como uno de los más importantes, ya que divide a los estreptococos del grupo A en 55 tipos inmunológicos. Otro antígeno encontrado es la sustancia T y el antígeno R, los cuales no se han relacionado con la virulencia del estreptococo (Gibbons, 1980)

El grupo serológico "A" pertenece a los estreptococos beta hemolíticos que son altamente patógenos para los seres humanos entre estos se encuentra *Streptococcus pyogenes*; que se ve implicado en enfermedades como: fiebre escarlatina, faringitis, impétigo, erisipela, fiebre reumática.

Los del grupo "B" están formados por organismos presentes en la garganta o en el aparato genital femenino; se ven implicados en infecciones neonatales, fiebre puerperal, osteomielitis, faringitis, se encuentra en este grupo el *Streptococcus agalactiae*.

El grupo "C" se ha aislado de las amígdalas purulentas y de la celulitis facial, en este grupo pertenecen *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus* y *S. dysgalactiae*.

Son principales patógenos de los animales, en los humanos se encuentran los organismos que se presentan con frecuencia en las muestras clínicas provenientes de pacientes de hospital.

El grupo "D" contiene a los enterococos, estos pueden no ser hemolíticos, se dividen en dos partes los organismos enterocócicos y los no enterocócicos, pertenecen a la flora habitual humana y se encuentran entre las especies

principales de la cavidad bucal y faringe, se encuentran en este grupo los *Streptococcus faecalis* y no enterocóccicos *S. bovis*, *S. equinus*.

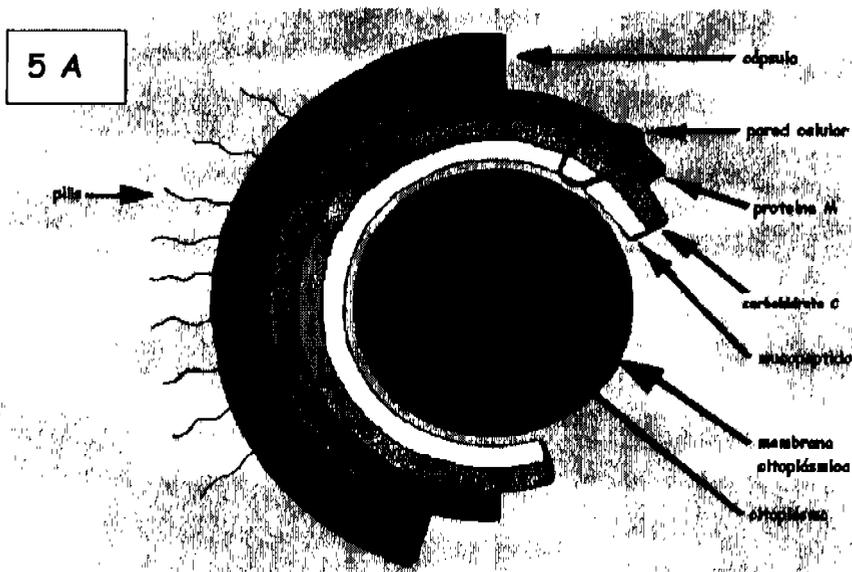
Los del grupo "E" no son comunes y presentan una patogenicidad muy limitada, estos se han aislado de la leche de la vaca, de los excrementos humanos y de ciertas patologías humanas.

Los grupos "F" y "G" son comensales de la boca y garganta presentan baja virulencia.

Los del grupo "L" y "M" son los más raros y se discute su implicación en las infecciones de humanos.

El grupo de los *Streptococcus viridans* incluye microorganismos abundantes dentro de la flora habitual de las vías respiratorias superiores, principalmente agentes de infecciones de tipo crónico, infecciones no mortales y endocarditis bacterianas subagudas (Gibbons, 1980, Kataoka, 1997).

Uno de los más importantes dentro de este grupo es *S. mutans* que sintetiza polisacáridos y contribuye de manera importante en el desarrollo de la caries dental.



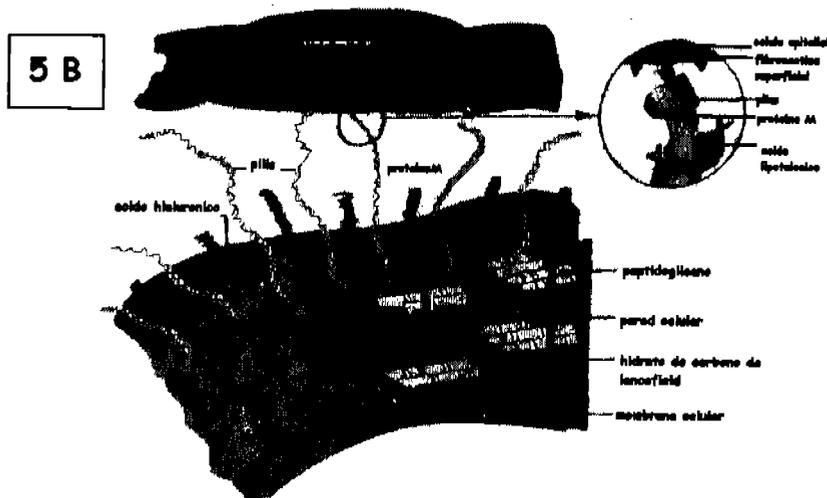


Fig. 5A, 5B. Representación de la estructura antigénica de los estreptococos.

### Estructura antigénica

Dependiendo de las especies y de la estructura se pueden distinguir, otras estructuras además del genoma, la membrana citoplásmica y la mureína, otros elementos de gran interés como son los siguientes

- Ácidos Teicoicos y Lipoteicoicos.

Asociados a la mureína, con carácter antigénico e intervienen en procesos de adhesión ya que se unen a la fibronectina de las células del hospedador. Forman un entramado fibrilar asociándose con las proteínas parietales superficiales y fimbrias (Gibbons, 1980, Gibbons, 1978)

- Carbohidratos Parietales (Polisacárido Antigénico Específico de Grupo Carbohidrato C).

Situados fuera de la mureína forma el 10% de la pared celular, tiene un carácter antigénico, divide a los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos en 13 grupos, participan en los procesos de adhesión, agregación y coagregación bacteriana (Gibbons, 1980,

Gibbons, 1978, Gibbons, 1988, Kataoka, 1997)

- **Proteínas Parietales.**

Localizadas por fuera de la capa de los carbohidratos parietales, se pueden encontrar intercaladas en la mureína dentro de las más importantes se encuentran la proteína M, la proteína T y la proteína R, que tienen diferentes funciones, unas poseen carácter antigénico de forma independiente en ocasiones asociadas a los ácidos lipoteicoicos y fimbrias, otras muestran una acción enzimática como glucosil y fructosiltransferasas y algunas se comportan como adhesinas fijándose a superficies blandas, ya sea individualmente o formando complejos. Pueden actuar como elementos receptores de glucanos. La proteína M es un factor importante en la producción de enfermedades, contribuye a la adhesión y da al estreptococo un estado antifagocítico protegiéndolo de los sistemas de defensa del organismo (Kataoka, 1997).

- **Fimbrias.**

Son estructuras filamentosas de 4 a 7 nm de diámetro, repartidas en toda la superficie que funcionan como adhesinas, las cuales interactúan con un receptor proteico o polisacárido situado en otra bacteria ó en una superficie tisular del hospedador así determina las uniones proteína-proteína o lectina-carbohidrato.

La función de adhesina reside en las proteínas y glucoproteínas que son capaces de unirse con gran afinidad a las cadenas laterales de polisacáridos presentes en la membrana citoplásmica de las células del hospedador a las que se adhieren.

Las fimbrias participan en la adhesión, agregación y coagregación bacteriana (Gibbons, 1988, Kataoka, 1997, Azen, 1981).

- **Cápsula.**

Es una estructura gelatinosa densa y viscosa localizada por fuera de la pared celular, con un grosor uniforme, constituida por polisacáridos y polipéptidos, también puede estar constituida por ácido hialurónico como componente adicional, todos éstos elementos son sintetizados inicialmente en la membrana citoplasmática

del estreptococo durante las primeras etapas de crecimiento, por lo que se le considera como un producto de secreción del metabolismo celular, aunque es un importante factor de virulencia ya que protege a la bacteria de la fagocitosis, si la bacteria posee hialuronidasa la pierde en la fase de crecimiento (Gibbons, 1988, Kataoka, 1997, Azen, 1981).

- **Glicocálix.**

Es una capa externa de aspecto pegajoso y gelatinoso constituida por polisacáridos (glucanos y fructanos) y polipéptidos, tiene un aspecto mucoso, ayuda a la configuración de la biopelícula bacteriana, es de gran importancia en el proceso de coagregación bacteriana además de que protege la superficie celular de los estreptococos de lesiones mecánicas o químicas y promueve la concentración de nutrientes procedentes del medio circundante, y su función más importante es la adherencia de las bacterias a las superficies inertes y a las células del hospedador en los procesos infecciosos, permitiendo así el establecimiento de colonias con un gran potencial para su crecimiento y supervivencia (Gibbons, 1988, Kataoka, 1997, Azen, 1981).

## **Factores de patogenicidad**

### **Enzimas:**

**Hialuronidasa:** Metaboliza el ácido hialurónico, constituyente de la sustancia intercelular del tejido conjuntivo del hospedador, favoreciendo así la diseminación de los microorganismos infectantes (Gibbons, 1978, Kataoka, 1997).

**Desoxirribonucleasa (estreptodornasa):** Actúa contra el ADN extracelular, altamente viscoso de los exudados purulentos. Hidroliza ácidos nucleicos y nucleoproteínas que los estreptococos utilizan como nutrientes (Gibbons, 1978, Kataoka, 1997).

Estreptocinasa (fibrinolisisina): Provoca la transformación del plasminógeno del suero humano en plasmina, enzima proteolítica activa que digiere a la fibrina impidiendo la formación de una barrera, lo que favorece la diseminación del microorganismo (Gibbons, 1978, Kataoka, 1997).

Además, pueden lizar los coágulos de sangre y son responsables de diseminación rápida.

Hemolisinas: los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos del grupo A, producen dos hemolisinas:

**Estreptolisina O.** Proteína antigénica con actividad hemolítica que se inactiva con el oxígeno, produce algunas de las hemólisis que se observan en cultivos de agar sangre, es citotóxica para los neutrófilos, las plaquetas y las células de tejido cardíaco.

**Estreptolisina S.** Proteína no antigénica que actúa en presencia de oxígeno. Produce una zona hemolítica alrededor de las colonias estreptocócicas que proliferan en la superficie de placas de agar sangre (Gibbons, 1980, Gibbons, 1978, Kataoka, 1997).

### ***Streptococcus viridans***

Se les llama *viridans* ya que producen un pigmento verde en los medios de agar sangre, son nutricionalmente exigentes, necesitan un medio complejo suplementado con productos sanguíneos una incubación enriquecida con dióxido de carbono al 5 o 10 % .

Forman parte del grupo heterogéneo de microorganismos que se caracterizan por presentar reacciones  $\alpha$  ó no hemolíticas en cultivos de agar sangre de carnero, su hábitat principal es en la cavidad bucal, colonizan superficies duras y blandas, son los microorganismos más abundantes en todos sus ecosistemas primarios (Gibbons, 1980, Gibbons, 1978, Kataoka, 1997)

Incluyen los grupos *mutans*, *oralis*, *salivarius* y *milleri*, cada uno con sus diferentes especies. El grupo mutans está constituido por las especies: *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. downei* y *S. Macacae* (Gibbons, 1978).

Participan en la formación de placa bacteriana y en la producción de caries, también participan en otros cuadros patológicos como gingivitis, abscesos periapicales, pulpitis y celulitis.

Habitualmente se clasifican por patrones de fermentación, composición de los azúcares de la pared celular y producción de dextranos o lévanos partiendo de sacarosa.

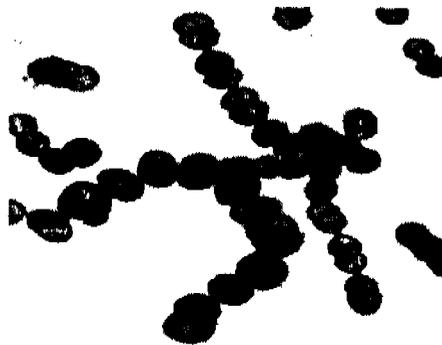


Fig.6 Cultivo de *Streptococcus* a 6500X. The Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Immunology, The Rockefeller University,

New York, New York 10021 © 1995

### ***Streptococcus mutans***

Son cocos gram positivos sin movilidad que se presentan en cadenas cortas o medianas, la estructura de su pared celular contiene un carbohidrato C, complejos fibrilares y fimbrias prominentes, sin embargo destacan las proteínas y los carbohidratos en cuya composición se encuentra la glucosa, ramnosa y galactosa (Gibbons, 1980).

La pared consta de 6.8% de proteína, 8.9% de ácido teicoico glicerol, 33.6% de polisacárido no peptidoglucano y 49.9% de peptidoglucano.

Son anaerobios facultativos, que presentan una temperatura óptima de desarrollo de 36°C y sus características coloniales dependen en gran parte del medio donde sean cultivados, en agar sangre de carnero son  $\alpha$  ó  $\gamma$ -hemolíticos, y excepcionalmente  $\beta$ -hemolíticos (Gibbons, 1978, Kataoka, 1997).

El medio más adecuado para su crecimiento es el Agar mitis-salivarius con sulfonamida y el Agar-mitis-salivarius (MSA), que contiene un 5% de sacarosa, y como sustancias inhibidoras, azul tripán, cristal violeta y telurito potásico, las cuales permiten el crecimiento de los estreptococos inhibiendo a otras bacterias (Kataoka, 1997).

El medio selectivo, es el mitis-salivarius-bacitracina (MSB), que es MSA al que se le añade 0,2 U/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por cada 100 ml. Las colonias se pueden observar elevadas, convexas, onduladas y opacas de color azul oscuro con márgenes irregulares, superficie granular, adheridas y con una burbuja de color brillante cuando produce polisacáridos extracelulares, su tamaño puede variar desde 0.5 a 1.0 mm de diámetro.

A diferencia de lo que ocurre con la mayor parte de otros estreptococos bucales, todas las cepas de *S. mutans* utilizan la sacarosa como fuente energética tanto para su desarrollo como para la formación de ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido fórmico, acético y etanol, produciendo un descenso del pH, situación por la cual, el *S. mutans* es considerado un agente etiológico de gran importancia en el desarrollo del proceso carioso (Gibbons, 1978, Gibbons, 1988, Kataoka, 1997).

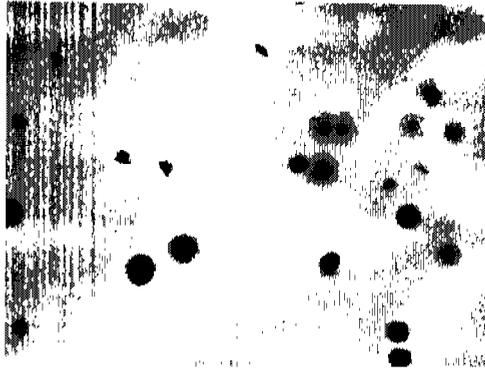


Fig.7 Cultivo de *S. mutans* en Agar mitis salivaris bacitracina

### **Metabolismo.**

La sacarosa se va a encontrar en el interior de la célula bajo la forma de sacarosa y sacarosa 6P, primero se origina fructosa y glucosa que fosforilizándose da lugar a glucosa-6-P, después por la acción de la sacarosa-6-P hidrolasa, surgen glucosa-6-P y fructosa, estos azúcares seguirán la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para rendir fundamentalmente lactato ya que son homolácticas.

La piruvatocinasa regula el sistema, de forma que con bajas concentraciones de sacarosa extracelular o de glucosa-6-P y fructosa 1,6-diP intracelular se inhibe la enzima y el fosfoenolpiruvato que se utiliza como medio de transporte.

Sintetizan homo polisacáridos extracelulares, a partir de la sacarosa que son tres tipos: glucanos hidrosolubles donde están incluidos los dextranos, glucanos insolubles formados por mutanos y fructanos, la formación de estos polímeros se debe a una o varias enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs).

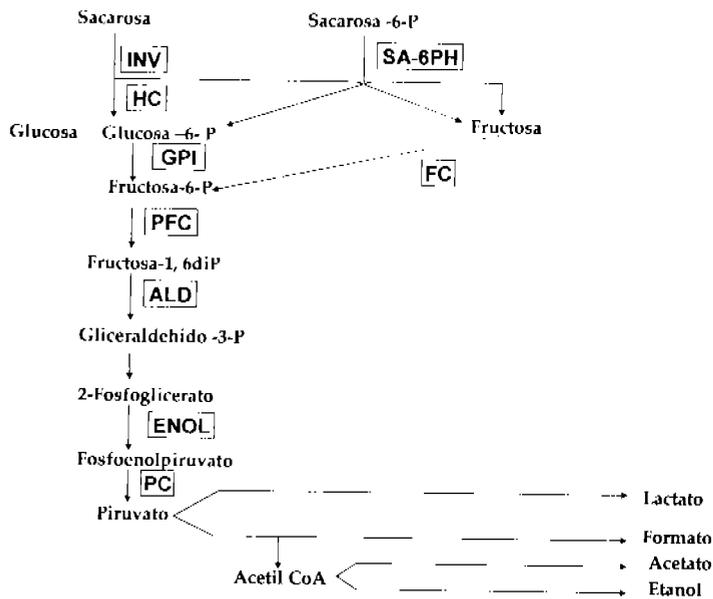


Fig.8 Esquema de la vía glucolítica .

Los glucanos insolubles son degradados con dificultad por las bacterias, poseen propiedades adherentes y forman parte importante de la matriz acelar de la placa.

*S. mutans* posee la capacidad de adherirse a diferentes superficies a través de elementos bacterianos denominados adhesinas, cuya función es fijar el microorganismo ya sea a la superficie o tejido del hospedador, a materiales artificiales u otras bacterias (Gibbons,1988, Kataoka, 1997)

Los receptores son compuestos que interactúan con las adhesinas, entre los que se encuentran la fibronectina de las células epiteliales, y el conjunto de proteínas y glucoproteínas salivales que se retienen en las superficies epiteliales o materiales artificiales como las prótesis dentales (Gibbons,1988, Kataoka, 1997)

## ***Biopelículas y adherencia bacteriana en la cavidad bucal***

La forma natural de vida bacteriana no es aislada, sino en asociación con otras comunidades, las cuales se adhieren a superficies formando una biocapa, conocida también como biopelícula (biofilm) (Watnick, 2000). La cavidad bucal no es la excepción, siendo así la placa dental bacteriana una compleja biocapa que comprende cientos de especies microbianas organizadas en comunidades en ambientes bucales fluctuantes.

La formación de placa dental en la cavidad bucal, se desarrolla en las superficies rígidas o mucosas bucales y es un componente integral de la salud o la enfermedad de ésta (Burne, 1997). El estilo de vida, en forma de biocapas, que poseen la mayoría de las bacterias bucales, permite una sobrevivencia y adaptación al ecosistema presentándose cambios genéticos, (Li Y-H, 2000) así como la optimización de recursos para la obtención de energía a partir de un metabolismo celular lento (Marsh, 1997).

El método más empleado para estudiar las comunidades bacterianas bucales asociadas al periodonto es a partir de sondas de DNA, clasificando a las bacterias en cinco diferentes grupos (por colores) asociado con las propiedades clínicas de la enfermedad periodontal en relación con la presencia de la bacteria. Los grupos descritos son:

**Rojo.** Comprende a: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, implicadas en la periodontitis juvenil

**Naranja.** Comprende a: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum* implicadas en la periodontitis del adulto.

**Púrpura.** *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus* que principalmente se encuentran en caries radicales y no implican una lesión periodontal.

Amarillo. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis* relacionados con la caries dental y no con la enfermedad periodontal.

Verde. Contiene tres especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo A, involucrados en la periodontitis juvenil y relacionados junto a otras bacterias con la gingivitis necrozante aguda (GUNA) (Kolenbrander, 2000).

Diversos autores describen a las biopelículas como una comunidad microbiana relativamente indefinible asociada a la superficie dentaria o a cualquier otro material duro, no descamable, la mayoría de estas biopelículas son una capa densa de microorganismos que está unida en una matriz de polisacáridos con otros materiales orgánicos e inorgánicos (Genco, 1993, Lindhe, 2000).

La capa fluida que bordea la biopelícula puede tener una subcapa más bien estacionaria y una capa líquida en movimiento, son ubicuas, se forman virtualmente en todas las superficies inmersas en medios acuosos naturales.

Se forman con rapidez en medios líquidos donde las bacterias reciben un aporte nutritivo regular, la formación rápida de capas visibles de microorganismos es típica de las biopelículas debido al amplio desarrollo microbiano y va acompañada por la excreción de grandes cantidades de polímeros extracelulares (Lindhe, 2000).

Podemos decir que la biopelícula es una sustancia adherente compuesta por bacterias y sus productos, células muertas, leucocitos y células descamadas dentro de una matriz de proteínas y polisacáridos, la cual se acumula con mayor facilidad en sitios retentivos (Kwan – Yat Zee, 1996)

La cantidad de matriz es variable, es aproximadamente el 30% de la biopelícula supragingival y muy escasa en subgingival. Básicamente hay tres puntos importantes que contribuyen a la matriz intermicrobiana: Primero, los microorganismos de la placa: las bacterias pueden excretar varios productos metabólicos que contribuyen a la formación de la matriz, así mismo encontramos bacterias en degradación o muertas.

Segundo, la saliva que funciona en parte para formar películas protectoras tenaces o cutículas en las superficies bucales expuestas, sirven como receptor para la colonización bacteriana inicial, y puede dar inicio a dos afecciones humanas más frecuentes: caries y enfermedad periodontal (Genco, 1993).

Tercero, el fluido crevicular, en esta matriz se ve un componente fibrilar entre los cocos grampositivos y coinciden con varios estreptococos bucales que sintetizan lévanos y glucanos de la sacarosa de la dieta (Lindhe, 2000).

La flora microbiana asociada con el diente y tejido periodontal en varios estados de salud y enfermedad muestran un alto nivel de organización (Listgarten, 1976) con marcadas diferencias entre biopelículas analizadas en salud y en enfermedad. Las bacterias asociadas con encía sana son predominantemente Gram-positivas, aunque existen, en menor número, Gram-negativas.(conocida como microflora normal).

La acumulación de bacterias sobre superficies sólidas no es un fenómeno odontológico exclusivo. Las biopelículas se forman en todas las superficies inmersas en medios acuosos naturales. Se forman con particular rapidez en medios líquidos donde las bacterias reciben un aporte nutritivo regular (Genco, 1993, Lindhe, 2000).

En la fig. 10 se esquematiza la formación de la biopelícula en cuatro fases: Adsorción molecular para favorecer la formación, adhesión bacteriana de microorganismos aislados, desarrollo de la matriz extracelular y multiplicación de las bacterias adherentes, adsorción secuencial de más bacterias para formar una biopelícula más compleja y madura (Lindhe, 2000).

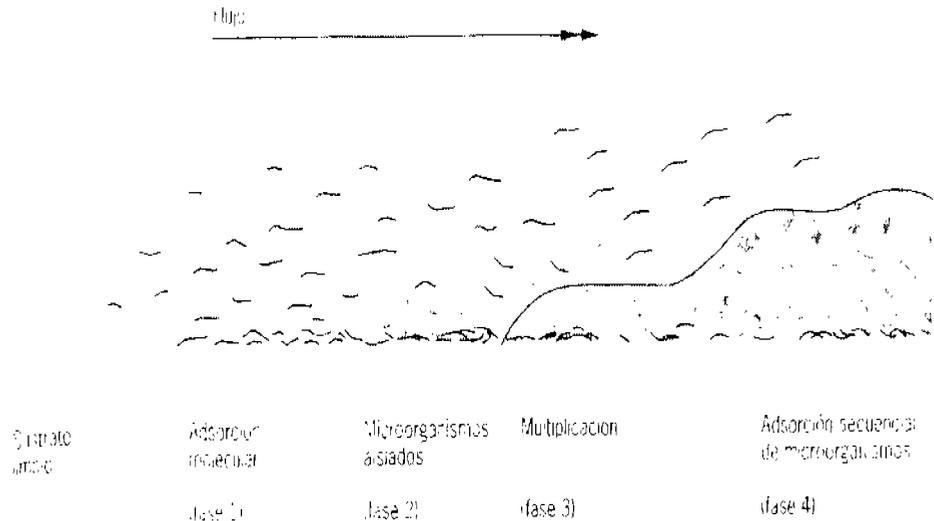


Fig.9 Esquema de la formación de la biopelícula

En el caso de la cavidad bucal, el proceso de la adherencia reinicia después de la limpieza de los dientes en donde las proteínas salivales y glucoproteínas presentan adsorción en el esmalte formando la película salival. Se puede observar que componentes salivales causan agregación significativa a la biopelícula (Gibbons, 1980). Se ha encontrado que las glucoproteínas mucinosas proveen un significativo potencial como moléculas receptoras, las cuales están involucradas en la agregación y adherencia de las bacterias (Demuth, 1990).

Las bacterias se adhieren de manera variable a estas superficies recubiertas. La masa bacteriana aumenta debido a la proliferación continua de los microorganismos adheridos, a la adhesión de nuevas bacterias y a la síntesis de polímeros extracelulares.

### **Biopelícula supragingival.**

La formación de la placa supragingival se inicia sobre la superficie dental cercana al margen gingival. Dicha placa se divide en dos etapas. La primera involucra la adherencia bacteriana (transporte y adhesión) a la superficie dentaria y la segunda implica la proliferación de las bacterias adheridas y la agregación de nuevas bacterias a este hecho se le denomina colonización. Tanto la primera como la segunda etapa involucran bacterias de diferentes especies.

Contiene aproximadamente 30% de matriz intermicrobiana. Se encuentra adherida a la superficie del diente y contiene predominantemente microflora Gram-positiva (Slots, 1991).

Las primeras bacterias que se adhieren al diente son cocos Gram-positivos aerobios facultativos. La biopelícula después de 24 horas se compone sobre todo de *Streptococcus*, siendo *S. sanguis* el más destacado. Posteriormente bacilos Gram-positivos, que inicialmente están presentes en números muy bajos y aumentan gradualmente como *Actinomyces*. Las superficies receptoras de los cocos y bacilos Gram-positivos ayudan a la adherencia de organismos Gram-negativos.

### **Biopelícula subgingival.**

La cavidad bucal presenta diversas superficies de adhesión bacteriana: el epitelio de la encía, el dorso de la lengua, las tonsilas, superficies del esmalte, el surco gingival y la bolsa periodontal (si se presenta) presentando estas dos últimas diferentes condiciones de crecimiento (Quirynen, 1995).

Las bacterias en el surco gingival y la bolsa periodontal se adhieren al cemento (Nyvad, 1987, Naito, 1988, Adriaens, 1988), al epitelio del surco y al epitelio de unión (Liakoni, 1987).

Con la acumulación y la maduración de la placa supragingival se producen cambios inflamatorios que modifican las relaciones anatómicas, entre el margen gingival y la superficie dentaria.

Esta área retentiva determina un medio en el cual pueden colonizar los microorganismos que no pueden adherirse con facilidad a las superficies duras pero que si pueden adherirse a otras bacterias y al epitelio de la bolsa.

En la formación de la placa subgingival también existe una combinación de reacciones de adhesión, coagregación y unión de microorganismos y se pueden distinguir tres zonas de placa subgingival. La relacionada con el diente, la no adherida o libre flotante y la relacionada con el epitelio.

En este caso la biopelícula esta compuesta predominantemente por organismos Gram-negativos y se encuentra menos adherida que la biopelícula supragingival. La placa no adherida o libre flotante contiene bacilos y cocos gramnegativos, así como un gran número de espiroquetas. Estas bacterias no se organizan de un modo específico y se mezclan con componentes no bacterianos.

La población de la biopelícula es mantenida en un estado de equilibrio (Marsh, 1997), pero la relativa proporción de especies puede ser alterada drásticamente por cambios en las condiciones ambientales (Marsh, 1991) tales como el potencial redox, el pH (Dermid, 1990) y la provisión de nutrientes esenciales (Marsh, 1992, Bowden, 1997).

El mecanismo preciso responsable de mantener la homeostasis en la biopelícula no es totalmente comprendido, pero incluye las interacciones sinérgicas y antagónicas. La estabilidad microbiana aumenta a través del desarrollo de las interrelaciones nutricionales; la acumulación de la biopelícula sobre el margen gingival provocan una respuesta inflamatoria del huésped, esta respuesta aumenta el flujo del fluido crevicular el cual provee una fuente de nutrientes a la microflora.

# ***Adherencia bacteriana e implicaciones odontológicas***

## **Adhesión bacteriana**

La adhesión bacteriana consiste en un fenómeno de interrelación que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedero. Bacterias, de especies similares o diferentes, se agregan entre sí para organizarse en placas o biopelículas y desencadenar así la iniciación de las enfermedades presentes en la cavidad bucal.

## **Mecanismo de adherencia**

El acto de establecer interacciones bacteria-bacteria ha sido nombrado "coagregación" o "coadhesión" siendo estudiado en células en suspensión o en un sustrato sólido. Junto con las ventajas que ofrece un grupo en biopelículas a la adquisición de nutrientes bacterianos, protección de mediadores de inmunidad, y tal vez intercambios genéticos, la coadhesión específica entre algunos grupos bacterianos. Han evolucionado probablemente como entre uno de varios tipos de interacciones de adhesión que fomenta el establecimiento y la retención de comunidades microbianas mezcladas en superficies (Ellen, 1997).

El principal mecanismo de adherencia de las bacterias consiste en la interacción específica entre dos moléculas, una bacteriana o adhesina y un hospedero llamado receptor.

En revisiones de (Kwan – yat Zee, 1996, Marsh, 1994, Gibbons, 1980, Demuth, 1990) se ha desarrollado una teoría que explica el mecanismo fundamental de la adhesión y consiste en:

Primera fase: Transporte a la superficie.

Segunda fase: Adhesión inicial.

Tercera fase: Adhesión específica.

Cuarta fase: Colonización.

## **Primera fase: Transporte a la superficie**

El transporte de la bacteria hacia la superficie puede ocurrir de diferentes modos: difusión por movimientos Brownianos, a través de la sedimentación de los microorganismos, debido al flujo salival y/o al movimiento bacteriano.

## **Segunda fase: Adhesión inicial**

Esta adhesión inicial se da por la interacción entre la bacteria y la superficie. Debe existir una distancia máxima aproximada de 50 nm para que intervengan fuerzas de largo y corto alcance.

### **Fuerzas de largo alcance**

Las bacterias pueden ser consideradas como partículas coloidales con vida (Slots, 1991) y como tales obedecen leyes físicas y químicas. A pesar de ello las bacterias no forman coloides "ideales" debido a que tienen la capacidad de expresar diversos componentes tanto interna como superficialmente.

Si una partícula coloidal se aproxima a una superficie interactúa con ella por medio de 2 fuerzas: las Fuerzas de van der Waals (primera fuerza la cual actúa a una distancia de aproximadamente 50 nm) y las fuerzas electrostáticas.

### **Fuerzas de corto alcance**

Si la partícula alcanza el mínimo primario (<2nm de la superficie) un grupo de fuerzas de corto alcance (puentes de hidrógeno, interacción estérica) dominan la interacción adhesiva y determinan la fuerza de adhesión. La bacteria en el mínimo secundario, puede alcanzar el mínimo primario pasando la barrera de energía, pero también se puede dar por protrusiones de la bacteria como fimbrias. Debido a que la fimbria tiene un radio considerablemente más pequeño la repulsión electrostática en estas estructuras disminuirá (dependiendo de su radio), la atracción de las Fuerzas de van der Waals permanecerá constante, por lo que la barrera de adhesión disminuirá.

### **Tercera fase: Adhesión específica.**

Después de la adhesión inicial un fuerte anclaje entre la bacteria y la superficie puede ser establecido por interacciones específicas, por contacto directo o por una unión de apéndices filamentosos extracelulares.

El principal mecanismo de adherencia de las bacterias consiste en la interacción específica entre dos moléculas, una bacteriana (adhesina) y otra del hospedador (receptor).

### **Adhesinas**

Su función es fijar las bacterias a una superficie, ya sea un tejido o material artificial u otras bacterias. Las principales adhesinas son: la pared celular, la cápsula, las glucosiltransferasas, proteínas que fijan glucanos, proteínas o glucoproteínas que se fijan a la película que recubre materiales duros o dientes, los ácidos teicoicos, de forma especial los lipoteicoicos, los polisacáridos del antígeno "O" y las fimbrias (Liébana, 2002).

### **Receptores**

Los receptores de los tejidos son reconocidos por las adhesinas de los microorganismos, van a ser los compuestos que interactúan con las adhesinas, puede tratarse de elementos celulares como, proteínas y glucoproteínas de la membrana citoplasmática, sustancias existentes en el medio de origen celular como fibronectina o mucina superficies lisas a través de la película adquirida.

Después de la limpieza de los dientes, las proteínas salivales y glucoproteínas son adsorbidas selectivamente a minerales apatíticos del esmalte. Esta película tiene generalmente un espesor de menos de 1  $\mu\text{m}$ . La película contiene pocas bacterias en las primeras etapas (Socransky, 1977), posteriormente la bacteria interactúa con ésta película por medio de reacciones moleculares específicas (Quirynen M&Bollen, 1995). Se sabe que componentes salivales causan agregación significativa a la superficie como son las: moléculas de alto peso, como glucoproteínas mucinosas

que inducen la agregación y adherencia de diversas bacterias (Nyvad, 1987), ya que proveen un significativo potencial como moléculas receptoras.

Esta capacidad de agregación ha sido tomada como un papel importante en la adhesión microbiana. Por instantes, glucoproteínas que contienen oligosacáridos pueden servir como receptores para *Streptococcus* (Naito, 1988).

Otras proteínas (IgA, lactoferrina, lisozimas y amilasa) han sido encontradas en una unión específica a microorganismos de la biopelícula, por lo que podrían actuar como receptores de unión. Sin embargo, la conexión directa todavía no ha sido establecida. Aunque todas estas proteínas pueden establecer una unión específica a las bacterias, su proporción impide tomarlas como uniones significativas (Adriaens, 1988, Liakoni, 1987).

La colágena y la fibronectina también sirven como receptores para adhesinas de diferentes bacterias.

Los mecanismos de adherencia microbiana más reconocidos son:

### **Adhesión por ácido lipoteicoico**

El ácido lipoteicoico está formado por carbohidratos fosfatados, generalmente glicerol y ribitol fosfato. Deriva de la membrana plasmática y penetra en la pared celular de los estreptococos, por lo que el microorganismo presenta una carga electronegativa que le permite adherirse al  $\text{Ca}^+$  de la saliva.

### **Adhesión por unión lectina- polisacárido**

Las lectinas reconocen residuos de glúcidos y se fijan a ellos. Esta unión se produce mediante las fimbrias y moléculas de superficie de algunos microorganismos, con polisacáridos que se encuentran en la película salival y en superficies de células procariotas y eucariotas. Este tipo de uniones se da también en los casos de coadhesión bacteriana (Liébana, 2002).

### **Adhesión por unión proteína-proteína**

Algunas adhesinas se unen con receptores proteicos (Lenderberg, 2000, Williams, 1992). Esta unión es mediada por componentes proteicos específicos del microorganismo y receptores proteicos complementarios en la superficie (Marsh, 1997, Marsh, 1991, Dermid, 1990).

### **Adhesión por polisacáridos extracelulares**

Intervienen glucanos insolubles mutanos y proteínas superficiales que fijan glucanos y glucosiltransferasas. Las glucosiltransferasas son enzimas que sintetizan glucanos y que pueden quedar unidas a la superficie bacteriana o ser liberadas al medio.

La síntesis de glucanos determina la unión entre las células, este transforma la absorción de *S. mutans* de reversible en irreversible y le facilita la acumulación de estos sobre la película salival.

### **Cuarta fase: Colonización**

El desarrollo de la placa se debe al crecimiento de las especies para formar microcolonias y a la coadhesión de más bacterias de la misma o de diferente especie. Esta coadhesión puede ser directa bacteria- bacteria debido a un receptor de unión específico (Marsh, 1992, Bowden, 1997) o puede ser mediado por macromoléculas salivales (Bowden, 1997)

El crecimiento de la placa es facilitado por la producción de polímeros extracelulares bacterianos. Ha sido establecido que el crecimiento de la placa ocurre preferentemente por multiplicación de los microorganismos ya adheridos que por la coadhesión.

## **Adherencia de *Streptococcus mutans*.**

El inicio de la formación de la placa dental depende de la adhesión bacteriana a los componentes salivales adsorbidos a la superficie dental. Varias especies de *Streptococcus viridans* han sido repetidamente encontrados como los colonizadores primarios de superficies dentales limpias (Scannapiego, 1995).

Varios estudios de la adhesión de especies de estreptococos bucales sugieren que los mecanismos responsables para la adhesión a las películas salivales son complejos. Hay una gran cantidad de mecanismos responsables de la adhesión estreptocócica (Scannapiego, 1995).

Es posible que la amilasa promueva la adhesión de las bacterias que utilizan éste sistema, los metabolitos de bajo peso molecular de las dietas de almidón mediadas por amilasa pueden aumentar la adhesión de bacterias a los dientes para promover la formación de placa dental. Además una gran cantidad de moléculas de amilasa se encuentran unidas por una sola célula estreptocócica, la pérdida de la aglutinación inducida por amilasa puede ser explicada por la localización tan peculiar de los receptores de la amilasa en la superficie de los estreptococos a los sitios polares y los sitios de división celular (Scannapiego, 1995).

Las investigaciones de Skopek y colaboradores demuestran que las proteínas salivales en la presencia de numerosas bacterias aumentan la adhesión, Likewise asegura que los alimentos compuestos, por proteínas semejantes a la caseína, reduce la probabilidad de adhesión por *S. mutans* (Willershausen, 1999).

La adherencia es promovida por altas concentraciones moleculares de glucoproteínas como aglutininas encontradas en la saliva de las glándulas parotida y glándula submaxilar y por proteínas promotoras de adherencia de saliva (Carlen, 1996).

Los glucanos se consideran agentes universales de adición que mantiene la placa unida, esta habilidad de unirse solo es para algunos *S. mutans* debido a que expresan una familia de enzimas glucosiltransferasas y proteínas de unión a glucanos (lectinas) que reconocen homológamente a los dominios glucano, la adherencia inicial de los *S. mutans* a la película es mediada por interacciones específicas vía glucanos y otras actividades de lectinas (Ellen, 1997).

La firme adhesión es mediada por enzimas extracelulares activas tales como las glucosiltransferasas (GTF), capaces de sintetizar glucanos adherentes. Las GTF se encuentran en la cavidad bucal en forma libre a las células bacterianas.

Algunos estudios sugieren que *S. mutans* presenta principalmente 2 genes (gtfB y gtfC) que codifican la síntesis de glucanos insolubles en agua (mutanos y fructanos) y un gen más (gtfD) que codifica la síntesis de un glucano soluble en agua (dextranos) (Tao, 2002).

Las GTF determinan la formación de glucanos insolubles los cuales son de peso molecular elevado (GTF-I), mientras que las que lo hacen con glucanos insolubles son de peso molecular bajo (GTF-S). Los glucanos y los fructanos son fácilmente degradables por enzimas de tipo glucanasas y fructanasas rompiendo los enlaces  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 2-6 y  $\beta$ 1-2, esto determina que se obtengan productos más sencillos (Liébana, 2002).

Produce 3 tipos de GTF: GTFB, GTFC, y GTFD que cooperan esencialmente para la adherencia, se demostró que GTF-C juega un papel importante en la producción de glucosa adhesiva que facilita la adherencia de *S. mutans* sobre superficies sólidas (Ooshima, 2001).

## ***Adherencia sobre materiales dentales***

Las superficies fijas de los dientes, prótesis y aparatos implantados adquieren películas bioquímicas por la absorción de moléculas de los ambientes ricos en proteínas como son: la saliva, el fluido crevicular, el suero y las matrices intercelulares (Ellen, 1997).

La superficie rugosa de una prótesis con un rebase suave ofrece una colonización mayor, cuando se compara con una prótesis convencional de resina acrílica (Dixon, 1999).

La adhesión de microorganismos a una superficie es un requisito para la colonización de dicha superficie. Los materiales utilizados en prótesis bucales y maxilofaciales son opacos, más permeables y susceptibles a la colonización microbiana (Verran, 1997). Los microorganismos bucales se adhieren a las superficies de dentaduras y a la mucosa bucal formando así la placa dental bacteriana (Okita, 1991). Sin embargo muchas bacterias bucales incluidos los estreptococos se encuentran asociados con la patología de la mucosa bucal (Okita, 1991).

La acumulación microbiana de los materiales de restauración es un problema potencialmente serio. Junto con las propiedades antimicrobianas, otros factores juegan también un papel en la adhesión entre ellos: la porosidad de las superficies y su textura así como la afinidad físico-química y biológica entre los materiales y las células microbianas (Okita, 1991).

Es bien sabido que se acumula menos placa en restauraciones de cerámica o porcelana y una superficie rugosa acelera la acumulación de dicha placa.

El incremento en la acumulación de placa en la superficie rugosa de una restauración cerámica no solo ejerce una virulencia causando caries sino que es una influencia nociva en el tejido periodontal. Para una restauración completa, el riesgo en la incidencia de caries es prácticamente nula, pero sin embargo se debe de poner atención en los tejidos gingivales. Un terminado deficiente en pulido genera superficies rugosas, induciendo a la acumulación mayor de placa y a la inflamación del tejido periodontal (Kawai, 2000).

Se ha reportado que la acumulación de placa en restauraciones cerámicas es menor comparada con otros materiales dentales como son las resinas o los metales. El total de los componentes de la placa, como células y glucanos se incrementa durante el tiempo de incubación. Otra razón puede ser derivada del hecho de que se acumula menos placa en una superficie que obtiene su característica lisa debido al sistema de pulido. Las superficies pulidas con diamante han demostrado la menor acumulación de células adheridas y glucanos (Kawai, 2000).

Sin embargo es frecuentemente aceptado que una superficie glaseada de una restauración de porcelana debe ser considerada como ideal. Los resultados reportados muestran que una mayor cantidad de placa se adhiere en superficies glaseadas, en comparación con otras superficies que sólo han sido pulidas (Kawai, 2000).

A pesar de que las superficies pulidas son conocidas por una falta de continuidad y micro-grietas en la sub-superficie de la porcelana, estos defectos superficiales no contribuyen a la adhesión total de placa (Kawai, 2000). Algunas consideraciones respecto a lo anterior mencionan: que el total de bacteria y glucanos adheridos aumentan durante el tiempo de incubación, a 24 horas, la adhesión de la placa pasa a formar una meseta.

Para la rugosidad de la superficie de cada método de terminado, las superficies sometidas a una pasta de diamante son mas lisas (menor en comparación con las superficies glaseadas).

Las superficies pulidas con pasta de diamante muestran una menor cantidad de adhesión de placa (que incluye a bacterias y glucanos).

A pesar de que la rugosidad de las superficies glaseadas es clínicamente aceptable. Sin embargo, se sugiere que el terminado con pasta de diamante podría ser el mejor método clínicamente aceptado desde la perspectiva de que minimiza la adhesión de la placa (Kawai, 2000).

Los materiales de restauración de base de resina para dientes anteriores en especial composites han tenido aceptación para restauraciones en dientes

posteriores utilizando materiales similares de valor dudoso en incrustaciones (Willershausen, 1999).

La mayoría de los autores menciona que algunas propiedades negativas de los materiales restaurativos son:

- a) Reducción para el polímero.
- b) Afinidad por el agua.
- c) Límites de seguir pulido
- d) Posible difusión de varios monómeros residuales dentro de la cavidad bucal.
- e) Adaptación de la pérdida marginal
- f) Pérdida de material a través de la abrasión (Willershausen, 1999, Rueggeberg, 1993).

Se han descrito tres tipos de bacterias con una alta habilidad para colonizar: *S. mutans* es un importante factor causal de lesiones cariosas, *S. oralis* es un organismo característico involucrado en las fases tempranas de la interacción con mucinas en formación de placa y *A. naeslundii*, es un colonizador de superficies radiculares y de las principales especies aisladas de placa supra gingival

(Willershausen, 1999, Gibbons, 1980).

Existen estudios de crecimiento de bacterias, por cambios en su actividad metabólica y daño sobre la superficie de materiales como consecuencia de crecimiento bacteriano a largo plazo; es bien conocido, que la adherencia y la actividad metabólica de microorganismos en la boca son la causa primaria de una variedad de condiciones que incluyen la caries dental y enfermedad inflamatoria de la encía y de los tejidos periodontales (Willershausen, 1999, Gibbons, 1980).

Los factores importantes que afectan la formación de la placa incluyen las superficies de sustratos libres de energía y la rugosidad de estas superficies, esto ha sido demostrado, que especies de bacterias particulares tienen una preferencia para colonizar ciertas partes del diente y algunas de estas se adhieren fuertemente al cemento o esmalte (Willershausen, 1999).

En la primera etapa de la formación de placa, la interacción inicial entre microorganismos y sustrato, hidrofóbico y electrostático son cruciales (Willershausen, 1999).

Adicionalmente se han hecho intentos de mejorar a los materiales basados en resina en un intento de que contengan un efecto antibacteriano por la adición de fluoruros, para que se libere gradualmente su contenido dentro del medio ambiente bucal (Willershausen, 1999).

Existen estudios en donde se compara la acumulación de placa sobre cementos de ionómero de vidrio y compuestos híbridos. Estos han mostrado que la superficie rugosa de los materiales tienen una gran influencia de acumulación de placa y que estos materiales liberan sustancias potencialmente antibacteriales.

Por otro lado, en otro estudio se observó que las propiedades superficiales son menos importantes para adhesión bacteriana que su composición (Willershausen, 1999).

Algunos estudios sugieren que existen cambios en la adherencia de bacterias en determinado tiempo sobre la superficie de compuestos basados en resina. La superficie de estos materiales fue observado por Microscopía Electrónica de Barrido donde se detectan pocos cambios sobre la superficie del material posterior a la exposición de *S. mutans*. Sin embargo fue significativa la colonización de las mismas debido a la aspereza de la superficie de resinas (Willershausen, 1999).

Otros estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran que las restauraciones de resina composite, tienden a acumular más bacterias y placa dental que otras restauraciones de otros materiales, con resultado de caries secundaria se muestra que el incremento de está; así como la acumulación de placa, se eleva con presencia de materiales de restauración (Tanagawa, 1999).

Tanagawa y colaboradores(1999), demuestran que las restauraciones con ionómero de vidrio con aleación de plata es antibacterial e inhibe el crecimiento de *S. mutans*, debido a que los iones de plata son selectivamente tóxicos para microorganismos procarióticos y se observa disminución de caries secundaria, se revisaron tres tipos de ionómero de vidrio (Novaron, Amenitop y AIS).

Además, existen muchos factores que juegan un papel importante en la acumulación bacteriana. Entre estos se encuentran: la calidad de la superficie, tamaño de la partícula, resistencia a la compresión, corrosión, desgaste entre otros, que implican *in vivo* modificaciones de propiedades físicas y químicas sobre los materiales de restauración (Maya, 1998).

### **Características del Polimetilmetacrilato**

La introducción de los polímeros acrílicos en odontología fue después de la Segunda Guerra Mundial, los polímeros sintéticos eran originalmente desechos de laboratorio, residuos que quedan después de ciertas reacciones orgánicas derivadas del petróleo y del gas natural.

Cuando la química moderna llega en los años 50 y 60 permite el aprovechamiento y desarrollo de este tipo de sustancias, siendo la resina acrílica o polímero acrílico el más utilizado en odontología para restauración de estructura dental y reemplazo de los dientes.

El metilmetacrilato es derivado del ácido poliacrílico, unido a un polímero nos da como resultado el polimetilmetacrilato usado en nuestro campo por sus diversas propiedades esenciales y su biocompatibilidad, además de ser un material económico, de fácil procedimiento y manipulación.

Su aplicación en rehabilitación bucodental es en bases de prótesis removibles totales o parciales, coronas provisionales, existen otros usos como son; portaimpresiones individuales, aparatos removibles de ortodoncia, resinas de

obtención directa, muñones, dientes artificiales, retención de brackets de ortodoncia, férulas de relajación y quirúrgicas, obturadores para fisuras, implantes quirúrgicos.



Fig.10 Mantenedor de espacios que se utiliza en ortodoncia.

El polvo esta compuesto por microesferas transparentes o pigmentadas de polímero de polimetilmetacrilato más peróxido dibenzoico como iniciador, él liquido corresponde al monómero de metilmetacrilato que contiene hidroquinona como estabilizador además un activador químico; como son aminas terciarias (Kenneth,1998).

Recordando que este material tiene una polimerización por adición estos componentes son importantes debido a las etapas que cursa el material los cuales son:

**Iniciación.** Hay radicales libres estos se obtienen por el peróxido de benzofllo que, durante el calor, sus moléculas se fragmentan en dos radicales libres, los cuales inician la polimerización del monómero del metilmetacrilato.

**Propagación.** Las reacciones en cadenas deberán continuar, con la evolución del calor, hasta que todo el monómero se transforme en polímero, pero la polimerización no se completa nunca.

**Terminación.** Las reacciones en cadena terminan por acoplamiento directo o por intercambio de átomos de hidrógeno de una cadena en crecimiento, los radicales libres interactúan y forman un enlace covalente.

**Transferencia de la cadena.** El proceso difiere de la terminación en que el estado activo se transfiere de un radical activo a una molécula inactiva creando un nudo de crecimiento (Kenneth, 1998).

Durante su manipulación se mezcla el polvo y el líquido hasta obtener una consistencia fluida, el amasado y la polimerización se realiza simultáneamente a su manipulación (Vallittu, 1999, Waltimo, 1999).

El polimetilmetacrilato es una resina clara que trasmite la luz en un campo ultravioleta con longitud de onda a 250 nanómetros, con una dureza de 18 a 20 Knoop, una resistencia a la tensión de 60MPa aproximadamente y una densidad de  $1.19\text{g/cm}^3$ , con un modulo de elasticidad de (2400MPa).

Es químicamente estable al calor, se ablanda a  $125^{\circ}\text{C}$  y puede ser moldeado como un material termoplástico, este muestra una tendencia a absorber agua mediante el proceso de imbibición (absorbe agua).

Su presentación es polvo y líquido, la manipulación como ya se comento se lleva acabo por la mezcla de polvo-líquido donde el liquido comienza a humedecer al polvo dando un aspecto y consistencia de arena, después el liquido disuelve al polvo parcialmente formando una masa pegajosa, cuando se ha producido la total disolución del polvo, se convierte en una masa plástica nada pegajosa, comienza a endurecer debido a la reacción de polimerización, la energía desprendida se elimina en forma de calor, de ahí que se produce un calentamiento en el acrílico, al final hay una contracción del acrílico.

# TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS

## Microscopio electrónico de Reflexión o *Scanning*

El Microscopio electrónico de reflexión o *scanning* también conocido comúnmente como Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

Se basa en la teoría de que un campo electromagnético actúa sobre un haz de electrones de manera análoga a la acción de una lente de cristal sobre un haz de fotones, no se puede usar en especímenes vivos debido al alto vacío requerido en ciertos MEB, los especímenes deben estar preparados y secos para poder observar (La practica histologica, 1998).

La introducción de la Microscopía electrónica en la investigación constituye un desarrollo significativo para los estudios microbianos en general, debido a que el tamaño de muchas bacterias se acerca al último poder de resolución del microscopio óptico (Lindhe, 2000).

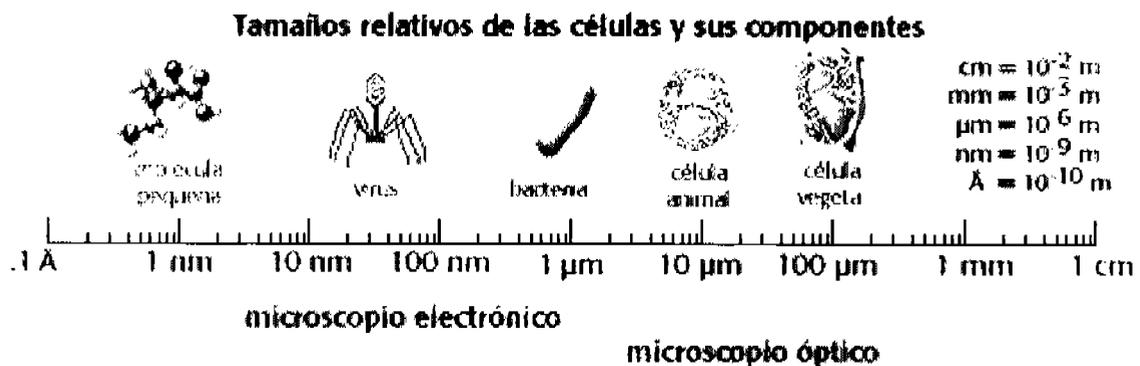


Fig.11 Esquema de los tamaños relativos de las células y sus componentes.

([fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/04\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/04_micro.htm))

Es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución la superficie de los sólidos y características morfológicas y topográficas de la muestra (Yacamán,1995).

Es un sistema de circuito cerrado de televisión. Los electrones emitidos de un cátodo de tungsteno son acelerados a través de un sistema de lentes magnéticas que disminuyen el diámetro del haz y una bobina de barrido desvía dicho haz sobre la muestra siguiendo un patrón de rastreo (Barrido). Cuando éste haz interactúa con la muestra se produce electrones secundarios, los cuales son colectados por un detector y posteriormente transformados y amplificados para producir una imagen visible en una pantalla de rayos catódicos (Fotones).

El microscopio cuenta con las siguientes partes: óptica electrónica, cámara del espécimen, circuitos de alimentación de la óptica electrónica, generación de alto voltaje y de producción de barrido, detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra, electrones retrodispersos y otros tipo de detectores y dispositivos para observación y registro de las imágenes (Vázquez , 2000).

Tiene una resolución de 10 a 20nm, la ampliación máxima del MEB fluctúa entre 15000 y 50000 diámetros. Al rastrear la superficie, el haz de electrones es absorbido por la superficie y genera una emisión secundaria de electrones captada por el sistema integrador y el decodificador de imagen para proyectarla en un monitor o bien en el sistema de registro de una placa fotográfica.

También se puede obtener, la imagen por reflexión del haz de electrones, absorción, catodoluminiscencia y Rayos X (La practica histologica,1998)

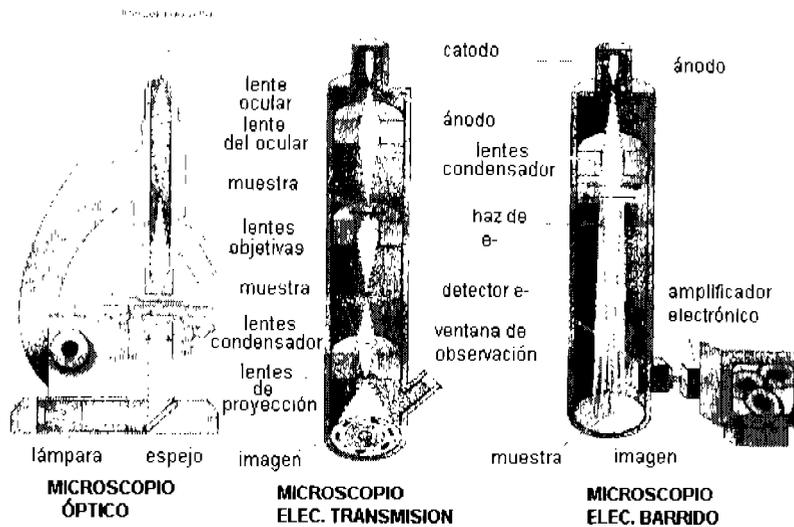


Fig.12 Esquema que resume las similitudes y diferencias entre los diversos tipos de microscopios.

([fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/04\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/04_micro.htm))

Las ventajas que ofrece este aparato es su gran profundidad de campo, una imagen tridimensional, la posibilidad de visualizar muestras de gran tamaño, una gran gama de aumentos, resolución, facilidad de variar el aumento sin modificar la distancia focal y la posibilidad de obtener del espécimen diversos tipos de información por ejemplo los análisis cuantitativo y cualitativo químicos (microanálisis) (Programas de estudio teorico-practico,1998).

Las muestras pueden ser orgánicas o inorgánicas y deben prepararse antes de ser observadas, estos especímenes deben desecarse e ionizarse con una capa conductora de carbón (60-100 nm) y con una película de metal (oro, plata, platino, paladio, etc.) de grosor semejante (La practica histologica,1998, Programas de estudio teórico práctico,1998).

## Estudio de Biopelículas

En algunas investigaciones se han utilizado diferentes métodos para el estudio de la adherencia de diversos microorganismos en materiales restaurativos, polimetilmetacrilato y resinas acrílicas. Que pueden ser tinciones, microscopía electrónica de barrido, microscopio fotónico, microscopio de fuerza atómica, marcadores radioactivos, entre otros. No solo centran el estudio en la adhesión, sino también en la formación y configuración de biopelículas, así como la interacción de determinadas proteínas o productos extracelulares que participan en la adhesión.

El estudio del “papel de la proteína RpoS en la formación de biofilms de *Escherichia coli*” se utiliza cristal violeta al 1% para poder realizar la cuantificación a partir de la decoloración del biofilm y después medir por espectrofotometría (Corona, 2002).

Annetta Razatos y colaboradores identificaron “determinadas moléculas de la adhesión bacterial por monitores de microscopía de fuerza atómica” (1998)

Ahn y colaboradores “papel de la proteína salival en la adherencia de *Streptococcus oralis* en varios brackets de ortodoncia” (2002) utilizan un marcador radioactivo, el cual emite una señal para determinar el número de células adheridas.

Kurt y cols. Reporta que en la “síntesis de glucanos in situ en película salival experimental, su función específica en sitios de unión para *S. mutans*” (1992) estudiaron un modelo para la adsorción de la bacteria a la Hidroxiapatita (HA), de manera similar a Clark y colaboradores(1978), donde se estudiaron las GTF en películas experimentales formadas sobre HA, se incorpora un marcador radioactivo

de glucosa en el polímero adherente y se cuantifico la señal emitida de este, el conteo directo determino el número de bacterias adherentes. También se examina la estructura de la película experimental y la observación directa de la unión de *S. mutans* a la HA por microscopía electrónica de barrido.

En "adherencia bacterial *in vitro* sobre películas de materiales de restauración estética" de Shanal y colaboradores (1998) utilizan electroforesis para determinar las proteínas salivales absorbidas sobre varios materiales dentales como Ionómero de vidrio y Oxido de Zinc, además utilizaron Microscopía electrónica de barrido para visualizar la adhesión de la bacteria en la superficie de las muestras.

Verran y colaboradores trabajan con "Retención de *Candida albicans* en resinas acrílicas y silicon con diferentes topografías de superficie" (1997), examinan las muestras por medio de microscopía de fluorescencia, haciendo un conteo del número de células adheridas por campos.

Otros estudios utilizan microscopía electrónica de barrido donde determinan el número de células adheridas, los cambios morfológicos que sufre el material, características de las superficies de las muestras y uniformidad en su topografía principalmente. (Vallittu y cols, 1999), (Monsenego y cols, 2000), (Willershausen y cols, 1999), (Waltimo y cols, 1999), (Kagermeier-Callaway y cols, 2000).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La microbiota bucal es una de las más complejas, variadas y pobladas de nuestro organismo, donde encontramos comunidades microbianas en equilibrio que viven adheridas a los tejidos epiteliales y dentales de la boca.

Los *Streptococcus* facultativos y anaerobios, *Veillonella*, y *Difteroides* facultativos y anaeróbicos suman aproximadamente el 80% de los microorganismos bucales.

Existen bacterias con características particulares que les proporcionan una alta capacidad de adhesión a tejidos inertes y superficies plásticas; estos están implicados en la salud periodontal y en la integridad del tejido dentario.

Conforme los dientes se pierden o se rehabilitan, los sitios disponibles para la colonización bacteriana van cambiando, los microorganismos requieren nuevas superficies donde adherirse para después colonizar, son las prótesis que sustituyen o rehabilitan a los dientes las que proporcionan un medio adecuado para multiplicarse y colonizar.

El polimetilmetacrilato (PMMA) es un material que se utiliza en la fabricación de provisionales para prótesis parcial, fija y removible, aparatos de ortodoncia, prostodoncia. Se menciona que las propiedades de este material favorecen de manera importante la adhesión bacteriana. La adherencia bacteriana es un requisito para la colonización.

El *Streptococcus mutans* posee una elevada capacidad de adherencia a superficies inertes y tejidos duros, representa uno de los modelos de adhesión y coagregación bacteriana más complejos en la formación de biopelículas dentales y de materiales plásticos, por lo que el estudio de su adherencia a la superficie del polimetilmetacrilato determina las bases de este estudio.

## **HIPÓTESIS**

Es mayor el número de bacterias de *S.mutans* adheridas a la superficie de especímenes de polimetilmetacrilato en un periodo de inoculación de 48 hrs que de 24 hrs.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar *in vitro* algunos factores relacionados con la adherencia del *S.mutans* sobre superficies de polimetilmetacrilato.

### **Objetivos Específicos**

Demostrar la formación de biopelículas sobre la superficie de especímenes de PMMA en diferentes periodos de tiempo (30 min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 hrs)

Identificar la participación de la porosidad del PMMA en la adherencia bacteriana.

Determinar la variación en el número de bacterias adheridas a la superficie de especímenes de PMMA a 24 y 48 hrs.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Preparación de especímenes**

La preparación de los especímenes se llevo a cabo él en Laboratorio de Prótesis de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

Se conformaron un total de 60 muestras de PMMA Jet Lang® con un conformador IPS-CORUM SHADE TAB®. Con base en la relación polvo/líquido y las instrucciones que nos da el fabricante de este PMMA. Las muestras se dividieron en 2 grupos de estudio.

Se realizaron experimentos para los siguientes grupos de estudio:

Especímenes con inoculación de 24 hrs.

Especímenes con inoculación de 48 hrs.

Los experimentos se realizaron por triplicado en 9 ocasiones diferentes.

### **Microbiología**

La preparación de los medios de cultivo, soluciones y prueba se realizaron en el Laboratorio de Patología Experimental Área de Microbiología (División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología, UNAM).

#### **Medios de cultivo y soluciones.**

##### **MSB (agar mitis salivarius-bacitracina)**

Como medio selectivo, se utilizo agar mitis salivarius-bacitracina (MSB), preparado con Agar Mitis-Salivarius (MSA) al que se le añade 0,2UI/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por cada 100 mL. En este medio *S. mutans* produce colonias convexas, onduladas y opacas de color azul oscuro con márgenes irregulares y superficie granular, que se adhieren a la superficie del agar y varían en tamaño desde 0.5 a 1.0 mm de diámetro.

### **TCSYB20 (Tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina)**

Medio de cultivo preparado con caldo de soya tripticasa 30gr, extracto de levadura 10gr, sacarosa 200gr, bacitracina 200 u/mL por cada litro de agua desionizada.

### **Caldo de Soya Tripticasa**

Preparada con 1 litro de agua desionizada y 30grs de polvo (DIFCO, USA).

### **Solución Neutralizadora**

Solución neutralizadora; preparada con caldo peptona de caseína-lectina-polisorbato 25gr, dextrosa 10gr, tioglicolato de sodio 1gr, tiosulfato de sodio 6gr, bisulfito de sodio 25gr, púrpura de bromocresol 0.002 gr, estos componentes por cada litro de agua desionizada.

### ***Preparación del inóculo***

De un cultivo puro de *S. mutans* se sembraron tubos inclinados de agar MSB por estría simple, se incubaron los cultivos a 36± 2° C durante 24-48 hrs.

Los cultivos puros se cosecharon en caldo TCSYB20, se centrifugaron y se lavaron en tres ocasiones con 10 ml de PBS y se obtuvo una suspensión de *S. mutans*.

De esta se preparó una suspensión de inoculación en caldo TCSYB20 estéril, calibrada a una concentración final de 0.1 en densidad óptica a 320nm la cual se midió por espectofotometría (Espectofotómetro Blo Rad® France), equivalente a  $1.5 \times 10^6$  cel/mL aproximadamente.

## ***Ensayo de Adherencia***

Para hidratar las muestras, cada una de ellas se sumergió en un frasco con 3 mL de agua desionizada estéril durante un periodo de 1 hr previo a la realización del ensayo de adherencia.

Una vez preparado el inóculo cada espécimen se sumergió en una suspensión de TCSYB20 conteniendo *S. mutans* a una concentración de 0.1 de densidad óptica 320 nm. Sumergidos los especímenes se incubaron durante 24 y 48 hrs a  $36 \pm 2^\circ$  C, sin agitación.

Pasado el tiempo de incubación cada espécimen se retiró de la suspensión y se lavaron por 10 ocasiones en un frasco con agua desionizada estéril para eliminar el exceso de caldo depositado en su superficie y dejar solo las células adheridas.

Lavados los especímenes, se sumergieron en un frasco con 3 mL de solución neutralizadora y se agitaron vigorosamente en un agitador vórtex (Vwr scientific) durante 30 segundos para desprender las células adheridas a la superficie del espécimen.

Una vez logrado el desprendimiento de las células de la superficie de polimetilmetracrilato, se obtuvo una suspensión de *S. mutans* en solución neutralizadora, de esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ l y se realizaron diluciones de  $10^1$  a  $10^7$  en caldo de Soya Tripticasa.

Cada dilución se sembró por vertido en placa con agar MSB y se incubaron las placas en anaerobiosis a  $36^\circ$  C durante un periodo de 24 a 48 hrs.

Se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada una de las placas, se incubaron a 24 y 48 hrs para el conteo se utilizaron las placas de las diluciones que presentaron colonias contables.

## ***Observación de la superficie del PMMA con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)***

Los especímenes se inocularon siguiendo el procedimiento ya descrito, con tiempos de 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 hrs. Pasado el tiempo de inoculación los especímenes se lavaron con PBS 10 ocasiones y se fijaron en etanol absoluto durante 5 min, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron para la observación en el MEB (JSM35CF).

Cada espécimen se monto en balines de latón y se ionizó con una capa de oro-paladio durante 3 min a 1500 KV y a 10  $\mu$ A.

Se realizaron observaciones rastreando el espécimen en su totalidad tomando micrografías en ampliaciones de 1000x hasta 10,000x.

### ***Muestras analizadas.***

Se analizaron muestras de polimetilmetacrilato autopolimerizable (PMMA) Jet Lang®.

### ***Tipo de muestra***

De conveniencia.

### ***Tamaño de la muestra***

Para el ensayo de adherencia se evaluaron 60 muestras, mientras que para la observación con MEB se elaboraron 10 muestras.

## **RESULTADOS.**

### ***Ensayo de adhesión a 24 y 48 hrs.***

Las bacterias adheridas a la superficie de los especímenes de PMMA, se calcularon mediante el conteo de UFC obtenidas a partir de las bacterias desprendidas, en periodos de 24 y de 48 hrs de post-inoculación.

La cuantificación de UFC en estos experimentos demuestran que a las 24 hrs de incubación el promedio de UFC fue de 72.6 y a las 48 hrs 139.9 (Tabla 2).

Con esto corroboramos que nuestro cultivo primario contenía la cantidad de bacterias necesarias para nuestra observación en MEB.

Tiempo	Promedio UFC (DS)
24hrs	72.593 ± 5.2
48hrs	139.889 ± 5.1

Tabla.2 Análisis del conteo de UFC

### ***Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)***

La formación de biopelículas, el desarrollo de *S. mutans* y su adhesión a la superficie de PMMA, fue demostrado utilizando un MEB.

Las observaciones con MEB proveen información sobre las diferentes morfologías superficiales del microorganismo en la estructura de las biopelículas en diferentes periodos de tiempo.

Se analizaron dos muestras como control positivo para observar las características morfológicas de *S. mutans* y del PMMA.(Fig. 13A y 13B) Donde el cultivo de *S. mutans* se desarrollo, es adecuado, así como su morfología. El acrílico nos mostró su heterogeneidad, libre de bacterias.

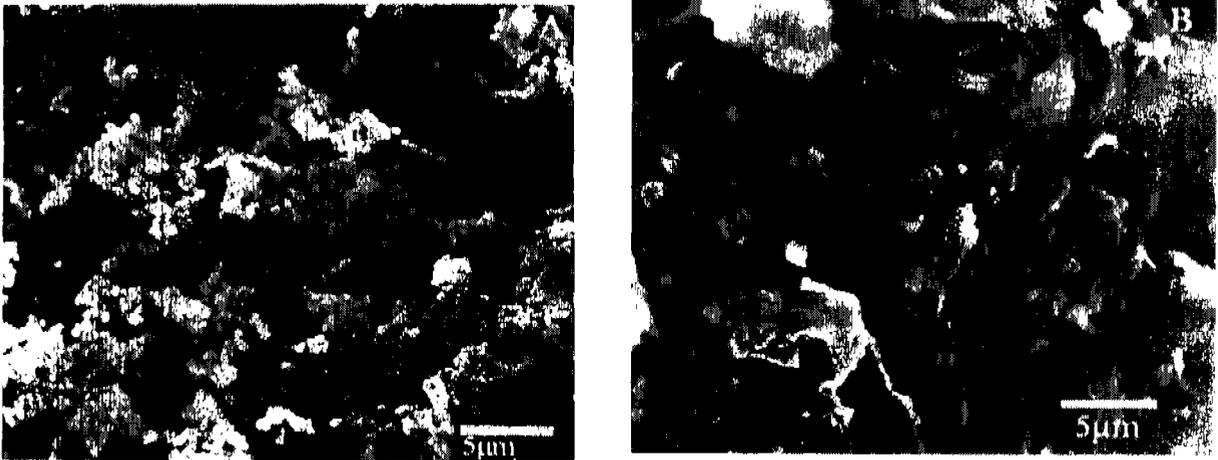


Fig. 13A y 13B. Micrografía de cultivo de *S. mutans*, espécimen de PMMA a 3200X.

El análisis morfológico de la formación de biopelículas en periodos de tiempo de: 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 hrs, se observaron en ampliaciones en 3200x con el objetivo de demostrar la formación de biopelículas sobre la superficie de los especímenes, así como las características morfológicas de *S. mutans* sobre el PMMA en diferentes periodos de tiempo.

El análisis de MEB fue cualitativo y en este observamos una diferencia notable entre 30 min y 48 hrs en cuanto al aumento de bacterias adheridas.

Su tamaño esta dentro de los parámetros de 0.5 a 1.0µm, donde se aprecia que fue aumentando entre 30 min a 48 hrs.

En las observaciones apreciamos que en nuestro espécimen de PMMA sin cultivo no hay presencia de oquedades y concavidades, no hay homogeneidad, en nuestro especímenes ya inoculados observamos oquedades.

A los 30 min (Fig.14) el aspecto del PMMA consiste en la apariencia de oquedades y así como la de bacterias.

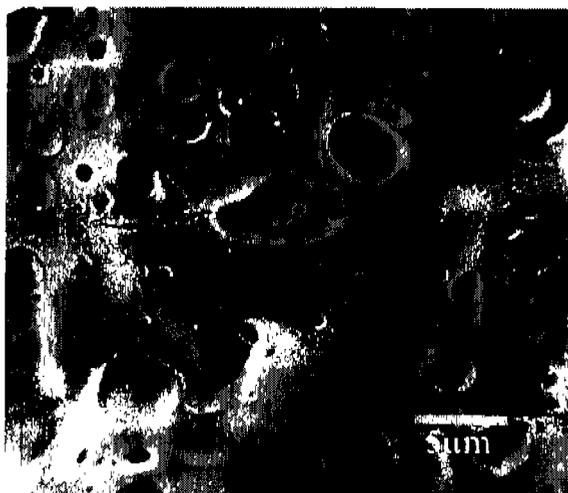


Fig. 14. Micrografía de 30 min de post-inoculación a 3200X.

Transcurridos 60 min (Fig.15) va aumentando la cantidad de bacterias y hay mayor colonización y ocupando espacios de las oquedades del PMMA.

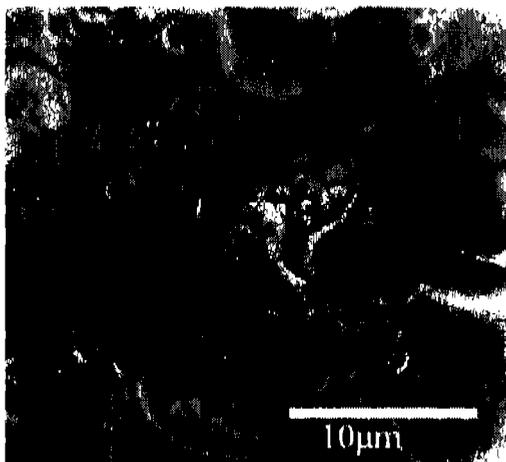


Fig. 15. Micrografía de 60 min de post-inoculación a 3200X.

A los 120 min disminuye la cantidad de bacterias, observándose solo en oquedades.

A las 3 hrs (Fig.16), también disminuye la cantidad de bacterias en comparación con 2 y 1 hr, su organización aumenta para su colonización, hay presencia de puentes intercelulares, se observan solo en las oquedades.

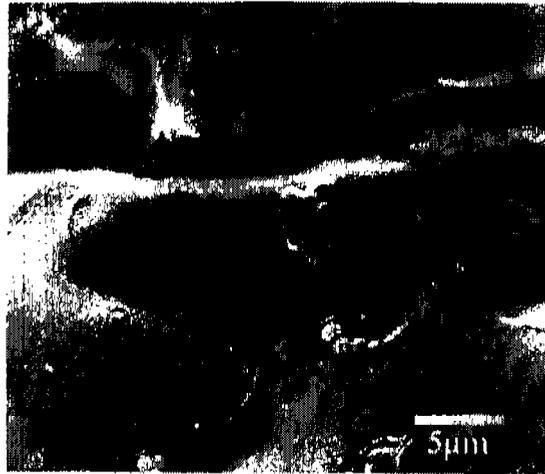


Fig.16 Micrografía de 3 hrs de post-inoculación a 3200X.

A las 6 hrs se denota la adherencia bacteriana en aumento, su organización en la colonización es mayor, los puentes intercelulares continúan y las bacterias continúan en las oquedades

Transcurridas 12 hrs (Fig. 17) las bacterias siguen en aumento, se observan cadenas aisladas y formación de puentes intercelulares, localizadas en las oquedades.

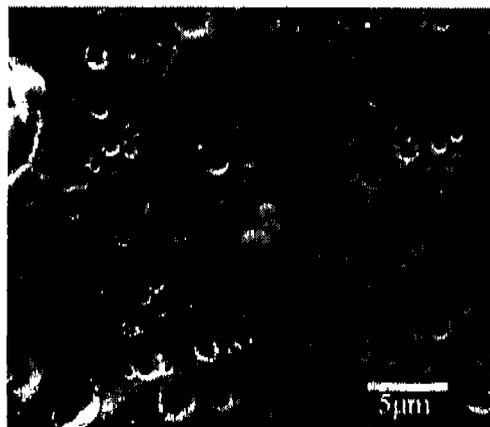


Fig.17 Micrografía de 12 hrs de post-inoculación a 3200X..

A las 24hrs (Fig.18) es un cambio notable ya que se incrementa la cantidad de *S. mutans*, se agrupan en múltiples colonias conglomerándose, hay puentes intercelulares, la adherencia bacteriana es observada tanto en la superficie lisa como en las zonas porosas, apreciándose completamente saturadas.

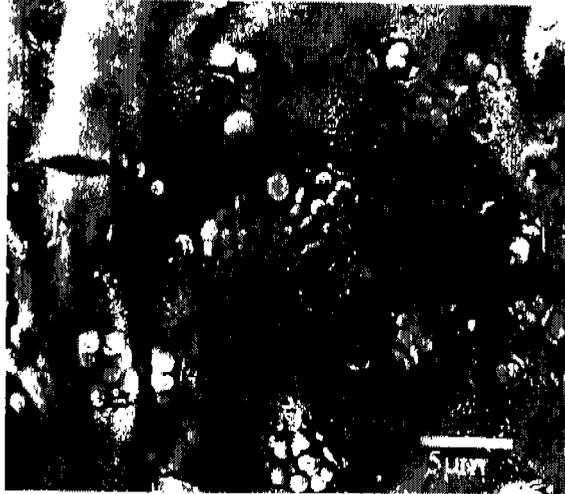


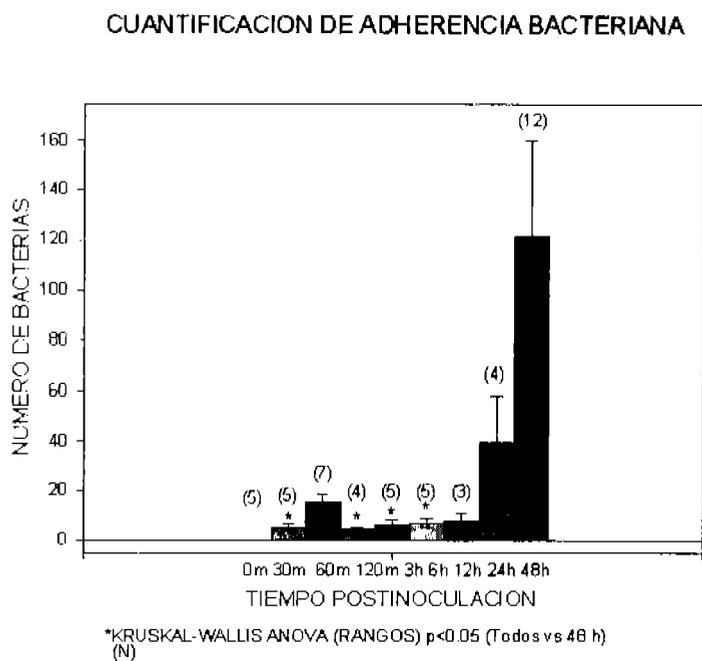
Fig.18 Micrografía de 24 hrs de post-inoculación a 3200X.

Hasta las 48hrs (Fig. 19) se observa la forma y tamaño de la bacteria invadiendo toda la superficie formando un conglomerado que recubre en su totalidad al material tanto defectos estructurales como superficies lisas.



Fig. 19 Micrografía de 48 hrs de post-inoculación a 3200X.

Se realizó un análisis de cinco campos, en fotos con una ampliación de 3200x donde se contó el número de bacterias. Como se puede observar, en la gráfica 1 la cantidad de bacterias se incrementó notablemente a las 24 y 48 hrs, la diferencia en la cantidad de éstas a las 48 hrs, comparadas con el resto de los tiempos fue estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).



Gráfica 1. Análisis estadístico del número de bacterias Kruskal-Wallis anova (rangos)  $p < 0.05$  (todos vs 48 hrs)

## **DISCUSIÓN**

La adhesión y colonización de microorganismos bucales en la superficie de los dientes y en restauraciones se considera crucial en el desarrollo de caries y enfermedad periodontal (Tanner, 2000) lo que motivo el presente estudio. La acumulación y maduración de placa bacteriana en el margen gingival es ampliamente reconocida como el factor etiológico primario en el desarrollo de la gingivitis crónica (Saito, 1997).

La adhesión bacteriana en la superficie de los dientes es un proceso complejo que involucra la formación de las películas salivales y la competencia de varios microorganismos bucales para adherirse en un sitio (Tanner, 2000), fenómeno que también ocurre en superficies acrílicas.

Las biopelículas dentales se forman en algunas superficies duras de la cavidad bucal, semejantes al esmalte, implantes, aplicaciones ortodónticas y materiales de restauración (Steinberg, 2002). La adhesión bacteriana sobre superficies sólidas ha sido explicada por interacciones físico químicas como son las diferencias de cargas de las superficies hidrofóbicas y parámetros termodinámicos (Tanner, 2000).

La fase temprana de la colonización comienza por los factores intrínsecos físico-químicos de las propiedades superficiales de los materiales para la restauración y por los mecanismos activo y pasivo de la adhesión bacteriana (Montarano, 2004), este estudio analiza la adhesión desde el punto de vista en la colonización bacteriana sobre materiales de restauración.

Los resultados de este estudio revelan que a 30 min hay presencia de *S. mutans*, inmaduro y la colonización es escasa, en cambio a las 24 y 48 hrs encontramos que la colonización ya esta más marcada y madura, no solo se presenta en las oquedades sino también en superficies lisas. Corroboramos la porosidad del material, es poroso y tiene defectos en la superficie lo que ayuda a la adherencia de la bacteria, es importante mencionar que conforme va pasando el tiempo *S. mutans* va aumentando la colonización.

Montanaro y colaboradores (2004) investigo la morfología in vivo con el MEB mostrando que la superficie de los materiales restaurativos aparecen cubiertos por células bacterianas, observando que algunos materiales posiblemente favorecen la formación de múltiples capas en la biopelícula, confirman la adhesión y la colonización de *S. mutans* en superficies de materiales restaurativos se lleva a cabo en la ausencia de proteínas específicas de la saliva en un periodo tan corto como de 4 hrs.

Los resultados obtenidos in vitro en este estudio demuestran que los microorganismos que forman parte de la placa bacteriana tal como el *S. mutans* se adhieren a la superficie de PMMA utilizado para restauraciones provisionales debido a la alta porosidad del material.

La adherencia bacteriana en varios materiales, incluyendo hidroxiapatita, células epiteliales y materiales dentales es extenso (Saito, 1997) La formación de biopelículas en materiales dentales es el resultado de interacciones físico químicas complicadas entre las superficies duras y la adsorción de macromoléculas y bacterias (Steinberg, 2002).

Nuestros datos son parcialmente relacionados a la alta capacidad de adhesión que presenta *S. mutans* a una variedad de superficies, particularmente biomateriales como el PMMA, el cual es ampliamente utilizado en Odontología, subsecuentemente estos microorganismos forman comunidades espaciales bien organizadas, particularmente en las zonas irregulares y porosas de la superficie de PMMA en periodos posteriores a 24 hrs, alcanzando una marcada madurez a las 48 hrs, como lo revelan nuestras observaciones realizadas con MEB.

Skopek y cols. (1993) condujeron un experimento de adhesión sobre superficies dentarias y concluyeron que el tipo de superficie y el tiempo son factores primarios de interés experimental, mencionan que en periodos de 4 a 24 hrs no se describe una relación entre la dinámica del crecimiento de la bacteria a diferentes tiempos en diferentes superficies. Nuestros análisis revela que existen diferencias significativas entre el número de células adheridas y sus características morfológicas en diferentes periodos de tiempo, presentándose mayor número de células adheridas

después de 24 y 48 hrs con morfologías bien delimitadas, agrupaciones definidas, confluentes y uniformes.

La resina autopolimerizable ofrece beneficios satisfactorios a corto plazo, pero su exposición al bolo alimenticio, saliva y otros fluidos, propicia cambios progresivos de color, además del deterioro de la textura de la superficie del PMMA (Emitiaz, 1998).

Los provisionales en prótesis, son fabricados de PMMA los cuales presentan diferentes tipos y grados de porosidades dependiendo de su manipulación, la textura con más porosidad, favorece la adherencia de microorganismos.

Una baja dureza y las porosidades de la superficie provee nichos en los cuales los microorganismos son protegidos de fuerzas externas como la higiene bucal, lo que permite que las células microbianas atrapadas se adhieran irreversiblemente a las superficies (Taylor, 1998). Diferentes estudios de laboratorio indican que las superficies lisas de esmalte y de acrílico son menos receptivas que las rugosas, en lo que se refiere a la colonización bacteriana y formación de placa (Phillips, 1991).

Nosotros observamos que la adhesión de *S.mutans* sobre superficies de PMMA y su posterior maduración ocurre en mayor grado en las zonas retentivas debidas a la porosidad del material, sin embargo cuando las biopelículas maduran la colonización se presenta tanto en zonas porosas, protegidas de fuerzas externas, donde los cocos se observan bien delimitados, agrupados y firmemente adheridos al material y entre sí.

Probablemente como lo describe Ooshima y cols (2001) las glucosiltransferasas (GTFc) juegan un papel muy importante en la producción de glucanos, los que facilitan la firme adherencia de *S. mutans* en superficies sólidas. En este sentido coincidimos con los resultados de Verran y cols (1997) respecto a que las diferencias de la topografía de la superficie, el substrato hidrofobico y químico afectan la unión de microorganismos a las superficies, observándose un alto número de células que se retienen en las superficies rugosas.

Algunos estudios han sugerido que ocurren cambios de la superficie de los materiales de restauración a base de resina, a causa de los efectos bacterianos por los componentes orgánicos de los materiales (Willershausen, 1999).

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que la adhesión y posterior colonización de

*S. mutans* puede ocurrir sobre superficies de polimetilmetacrilato material universal utilizado en Odontología para la fabricación de prótesis provisionales y otras restauraciones, sin la presencia de proteínas salivales o algunos otros factores presentes en la cavidad bucal que facilitan la adhesión.

Conforme se aumento el tiempo de incubación se observo mayor cantidad y mayor colonización de *S. mutans*. A los 30 min, 1, 2, 3, 6 y 12 hrs *S. mutans* se observa desarrollándose principalmente en las porosidades del material que incluyen las oquedades y diversos defectos del material.

Después de 24 hrs *S. mutans* se organiza en múltiples colonias en una mayor extensión que incluye tanto porosidades como superficies lisas formando múltiples colonias, agrupándose en cadenas y conglomerados complejos.

Observamos que en el espécimen de PMMA limpio no hay presencia de oquedades, pero el material se aprecia que no es homogéneo, en cambio los especímenes ya inoculados con *S. mutans* presentan oquedades.

Es de suma importancia tener en cuenta que en el periodo de 30 min ya hay adherencia bacteriana más no una maduración y organización adecuada en la colonización, lo que nos permitiría recomendar el uso de un antiséptico como método de prevención y buscar alguna otra alternativa para intervenir en la maduración de las bacterias y así evitar principalmente la enfermedad periodontal. Para mayor efecto en la colocación de restauraciones definitiva en un futuro en Odontología.

El conocimiento básico de la microscopía es importante para todas las ciencias aplicadas. Podríamos trabajar con un microscopio sencillo hasta uno sofisticado dependiendo de la investigación. No se puede iniciar un protocolo hasta tener la información y orientación del estudio que se realizará.

Durante la investigación se va adquiriendo más conocimientos de el proyecto lo que puede llegar a desviar el tema inicial y concluir con otra hipótesis.

Los odontólogos convivimos a diario con microorganismos bucales que se prestan para la colonización en ciertos materiales de restauración y dependiendo de sus características así como propiedades de los microorganismos se adhieren más.

El MEB es una herramienta, que ayuda a perfeccionar las investigaciones relacionadas con nuestra área. Porque observamos la superficie, topografía, morfología y otras características, tanto del microorganismo y materiales e inclusive de los propios dientes.

Esto agrandaría los conocimientos para poder evitar la colonización de microorganismos en la boca como en los materiales de restauración y dar una alternativa a los problemas que estos ocasionan.

Con esta alternativa diagnóstica, se logró conocer los detalles de la colonización bacteriana, y los defectos de manipulación del PMMA esperando que esto sirva para evitar esta falla odontológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA & Loesche WJ (1988). **Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth.** J Periodontol 159, 493-503.
2. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. (2002). **Roles of Salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets.** J. Dent Res 81, 411-415.
3. Azen EA, Denniston C (1981). **Genetic Polymorphism of PIF (Parotid Isoelectric Focusing Variant) Proteins with Linkage to the PRP Parotid Proline- rich Protein) Gene Complex.** Biochem Genetics 19, 475-485.
4. Bowden GHW. (1997). **Nutritional Influences on biofilm development.** Adv. Dent. Res 11, 81-99.
5. Branting C, Sund ML, Linder LE (1990). **The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro.** Archs oral Biol 34, 347-353.
6. Burne RA, Chen YYM, Penders JEC (1997). **Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms In vitro.** Adv Dent Res 11, 100-109.
7. Carlen A, Olsson J (1996). **Saliva mediated adherence, agregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces spp*, in young and elderly humans.** Archs oral Biol 41,1133-1140.
8. Clark WB, Gibbons J (1978). **Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of**

- Streptococcus mutans* 6715 to hydroxyapatite surfaces.** Infect Immun 18, 514-523.
9. Corona-Izquierdo FP (2002). **Estudio del papel de la proteína RpoS en la formación de biofilms en *Escherichia coli*.** Tesis de Maestría en Ciencias Odontológicas, UNAM
  10. Demuth DR, Gloub EE, Malamud D (1990). **Streptococcal- host interactions: Structural and functional analysis of *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary glycoprotein.** J Biol Chem 265, 7120-7126.
  11. Dermid AS, Kee AS, Marsh PD (1990). **Interactions and pH optima for growth of three black-pigmented *Bacteroides* species (abstract).** J Dent Res 69, 999.
  12. Dixon DL (1999). **Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*.** J. Prosth Dent 81, 207-214.
  13. Dorey J (1985). **Oral Mucosal Disorders in Denture Wearers.** J. Prosthet Dent 53, 210-213.
  14. Ellen RP, Lépine G, Nghiem P (1997). **In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria.** Adv Dent Res 11, 33-42.
  15. Emtiaz S, Tarnow (1998). **Processed acrylic resin provisional restoration with lingual cast metal framework,** J. Prosthet Dent 79, 484-488.
  16. Genco. R (1993). **Periodoncia.** Interamericana Mc Graw Hill.
  17. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB (1988). **Adsorbed salivary proline- rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatic surfaces.** Infect Immun 56, 2990-2993.
  18. Gibbons RJ, Qureshi JV (1978). **Selective binding of blood group- reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms.** Infect Immun 22, 665-671.

19. Gibbons RJ, Van Houte (1980). **Bacterial adherence and the formation of dental plaques.** In: Ehbeachey (Ed.) Bacterial adherence, 61-104.
20. Hay DI. (1983). **Human glandular salivary proteins.** In: CRC Handbook of experimental Aspects of Oral Biochemistry , 319-335.
21. Kagermeier-Callaway AS, Willershausen B, Frank T, Stender E (2000). **In vitro colonisation of acrylic resin denture base materials by *Streptococcus oralis* and *Actinomyces viscosus*.** J Int Dent 50, 79-85.
22. Kataoka K, Amano A, Kuboniwa M, Horie H, Nagata Hideki, Shizukuishi S (1997). **Active sites of salivary Proline- Rich Protein for Binding to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae.** Infect Immun 65, 3159-3164.
23. Kawai K, Urano M, Ebisu S (2000). **Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans.** J. Prosthet Dent 83, 664-667.
24. Kenneth J, Anusaeuice DMD (1998). **La ciencia de los materiales dentales de Phillips.** Decima edición, Mc Graw-Hill Interamericana.
25. Kolenbrander PE (2000). **Oral Microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems.** Annu Rev Microbiol 54, 413-437.
26. Kurt MS, William HB (1992). **Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding site for *Streptococcus mutans*.** Infect. Immun 60, 284-295.
27. Kwan-yat Zee, Lakshman PS , Attström R (1996). **Predominant cultivable supragingival plaque in chinese “rapid” and “slow” plaque formers.** J Clin Periodontol 23, 1025 – 1031.
28. Lenderberg (2000). **Enciclopedia of microbiology.** Second editio 35.

39. Marsh PD, Bradshaw DJ (1997). **Physiological approaches to the control of oral biofilms.** Adv Res 1, 176-185.
40. Maya M, Osnat K, Pnina E, Rodika G, Michael N (1998). **Accumulation of *Streptococcus mutans* on Light-Cured composites and amalgam: and in vitro study** J Esthetic Dentistry 10, 187-190.
41. Monsenego P (2000). **Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study "in vivo".** J. Oral Rehabil 27, 708-713.
42. Montanaro L, Lampoccia D (2004). **Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials.** Biomaterials 25, 4457-4463.
43. Naito Y, Gibbons RJ (1988). **Attachment of bacteroides gingivalis to collagenous substrata.** J Dent Res 67, 1075-1080.
44. Nikawa H (1999). **A review of In Vitro and In Vivo Methods to Evaluate the Efficacy of Denture Cleansers.** J Int Prosthodont 12, 153-159.
45. Nikawa H, Samaranayake LP (1997). **Effects on dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces.** Mycopath 139, 87-91.
46. Nyvad B, Ferjeskov O (1987). **Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo.** Scandinavian J Dent Res 95, 287-296.
47. Okita N, Orstavik D, Orstavik J, Ostby K (1991). **In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity.** Den Mater 7, 155-160.
48. Ooshima T, Matsumara M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T (2001). **Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*.** J Dent Res 80, 1672-1677.
49. Phillips Rw (1991). **La ciencia de los materiales dentales de Skinner,** Editorial Interamericana-Mc Graw Hill, Novena edición, México D.F, 615

50. Quirynen M, Bollen CML (1995). **The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man.** J Clin Periodontol 22, 1-14
51. Radford DR, Challacombe SJ (1999). **Denture Plaque and Adherence of *Candida albicans* to Denture-base Materials and vivo and in vitro.** Crit Rev Oral Biol Med 10, 99-116.
52. Razatos A, Ong L, Sharma M (1998). **Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy.** Proc Natl Acad Sci, 95, 11059-11064.
53. Rueggerberg FA (1989). **A urethane dimethacrylate (UDMA) microfilled composite bonded weakly to BIS-GMA composite, therefore their combined use should be avoided.** J Prosthet Dent 61, 117.
54. Saito T, Takatsuka T, Kato T, Ishihara K, Okuda K. (1997). **Adherence of oral streptococci to an immobilized antimicrobial agent.** Archs oral biol 42, 539-545.
55. Samaranayake LP (1986). **Nutritional factors and oral candidosis.** J Oral Pathol 15, 61-65.
56. Samarayanake YH, Mac Farlane TW (1994). **The in vitro proteolytic and saccharolytic activity of *Candida* species cultured in human saliva.** Oral Microbiol Immunol 9, 229-235.
57. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ (1995). **Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite.** J Dent Res 74, 1360-1366.
58. Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovie K (1998). **In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials.** J Oral Rehabilitation 25, 52-58.
59. Skopek RJ, Liljermark WF, Bloomquist CG, Rudney JD (1993). **Dental plaque development on defined streptococcal surfaces.** Oral Microbiol Immunol 8, 16-23.
60. Slots J, Taubman M (1991). **Contemporary oral microbiology and immunology.** Ed Mosby Year book, 283.

61. Socransky SS (1977). **Microbiology of periodontal disease- Present status and future considerations.** J Periodontol 48, 497-504.
62. Steinberg D, Eyal. S (2002). **Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials.** J Dentistry 30, 47-51.
63. Tanagawa M, Yoshida K, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M (1999). **Inhibitory effect of antibacterial resin composite against *Streptococcus mutans*.** Caries Res 33, 366-371.
64. Tanner J, Vallittu P (2000). **Adherence of *Streptococcus mutans* to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prosthetic dentistry.** J Biomed Mater Res 49, 250-256.
65. Tao L, Tanzer JM (2002) **Novel sucrose-dependent adhesion co-factors in *Streptococcus mutans*,** J Dent Res 81, 505-510.
66. Taylor R, Maryan C (1998). **Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes.** J Prosthet Dent 80, 592-597.
67. Tuomas W (1999). **Adherence of *Candida albicans* to the Surface of Polymethylmethacrylate-E Glass Fiber Composite Used in Dentures.** J Int Prosthodont 12, 83-86.
68. Vallittu P (1999). **Flexural properties of acrylic resin polymers reinforced with unidirectional and woven glass fibers.** J Prosthet Dent
69. Vázquez Nin G. (2000). **Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas,** México D.F, Fondo de cultura económica.
70. Verran J (1997). **Retention of *Candida albicans* on Acrylic Resin and Silicone of Different Surface Topography.** J. Prosthet Dent 77, 535-539.
71. Voet D, Voet JG (1990). **Bioquímica,** Ed Omega S.A: 187,188.

72. Waltimo T (1999). **Adherence of *Candida albicans* to the Surface of Polymethylmethacrylate-E Glass Fiber Composite Used in Dentures.** J Int Prosthodont 12, 83-86.
73. Watnick P, Kolter R (2000). **Biofilm, city of microbes.** J Bacteriol 182, 2675-2679.
74. Willershausen B, Callaway A (1999). **The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials – an in vitro study.** J Int Dental 49, 231-239.
75. Yacamán Miguel José (1995), **Microscopía electrónica una visión del microcosmos**, Consejo nacional de ciencia y tecnología, Fondo de cultura económica, México.