

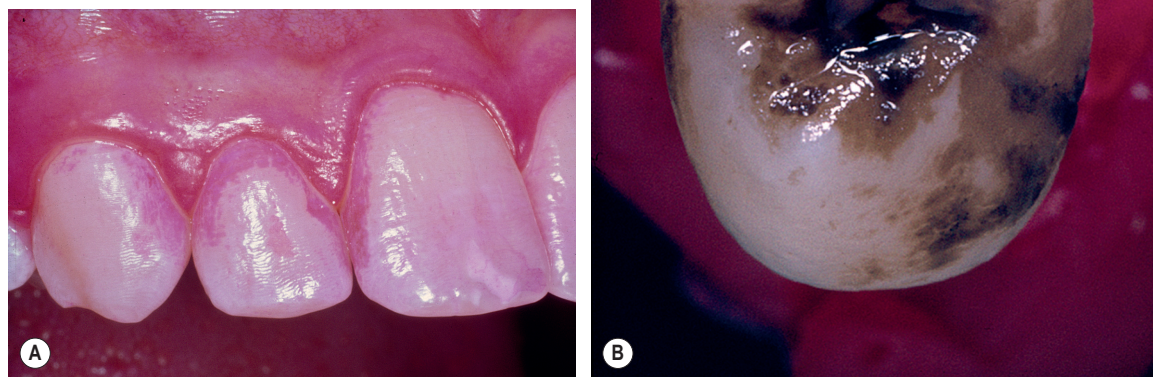
## Placa dental

<b>Biofilms microbianos</b>	<b>74</b>
<b>Biofilms en la boca</b>	<b>77</b>
<b>Mecanismos de formación de la placa dental</b>	<b>78</b>
Formación de la película adquirida	78
Transporte de microorganismos y unión reversible	79
Colonizadores microbianos pioneros y unión irreversible (interacciones receptor-adhesina)	80
Coagregación/coadhesión y sucesión microbiana	82
Formación del biofilm maduro	83
Separación de las superficies	85
<b>Consecuencias de la formación del biofilm</b>	<b>85</b>
Impacto en la expresión de gen	85
Señalización de la célula-célula	86
Transferencia del gen	87
Tolerancia antimicrobiana	87
<b>Estructura de la placa dental madura</b>	<b>87</b>
<b>Composición bacteriana de la comunidad clímax de la placa dental de diversos sitios</b>	<b>90</b>
Placa de la fisura	90
Placa proximal	91
Placa gingival del surco	92
Placa de la prótesis	92
Placa dental de animales	94
<b>Fluido de la placa</b>	<b>95</b>
<b>Cálculo</b>	<b>96</b>
<b>Interacciones microbianas en la placa dental</b>	<b>96</b>
<b>Placa dental como una comunidad microbiana</b>	<b>99</b>
<b>Homeostasis microbiana en la placa dental</b>	<b>100</b>
<b>Resumen del capítulo</b>	<b>101</b>
<b>Lectura adicional</b>	<b>102</b>

La placa dental es un término general para la comunidad microbiana compleja que se desarrolla en la superficie del diente, empotrada en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival. La placa que se calcifica se refiere como cálculo o tártaro. La presencia de placa en la boca puede ser demostrada fácilmente enjuagando con una solución reveladora tal como la eritrosina (Fig. 5.1). La mayoría de la placa se encuentra asociada con las regiones protegidas y estancadas de la superficie del diente tales como las fisuras, las regiones proximales entre los dientes y el surco gingival (véanse Figs. 2.2 y 5.1). La placa se encuentra naturalmente en la superficie del diente, y forma parte de las defensas del huésped, excluyendo la especie exógena (y a menudo patógena) (resistente a la colonización) (Tabla 4.7). Ocasionalmente, sin embargo, la placa se puede acumular más allá de los niveles compatibles con la salud oral, y ésta puede llevar a cambios en la composición de la microflora y predisponer los sitios a la enfermedad (Cap. 6). La placa dental es un ejemplo de un biofilm y de una comunidad microbiana, y la significación de esto será explicada en las secciones siguientes.

### BIOFILMS MICROBIANOS

Numerosos estudios de una gama de ecosistemas distintos han mostrado que la gran mayoría de los microorganismos que existen en la naturaleza están asociados a una superficie. El término «biofilm» se utiliza para describir a las comunidades de microorganismos unidos a una superficie; tales microbios están usualmente organi-



**Fig. 5.1** Visualización de la placa dental después de la tinción con una solución reveladora. (A) La placa está típicamente localizada en las áreas de retención y de estancamiento a lo largo del margen gingival y entre los dientes (áreas proximales). (B) Gran acumulo de placa en la superficie oclusal de un tercer molar en erupción; la placa se establece preferencialmente en las fisuras. Tomado de Marsh PD y Nyvad B, La microflora oral y los biofilms sobre los dientes, en la caries dental. The disease and its clinical management, 2da edición, Fejerskov O y Kidd EAM, Blackwell, Oxford, 2008; págs. 163-187, publicadas con permiso.

zados de manera espacial en una estructura tridimensional y están encerrados en una matriz de material extracelular (a veces llamado un «glicocalix») derivados de las células de ellos mismos y de su ambiente. Si (a) los microbios del biofilm fueran simplemente células plancónicas (fase-líquida) que se habían adherido a una superficie y (b) las propiedades de las comunidades microbianas fueran simplemente la suma de las poblaciones constitutivas, entonces el interés científico en tales individuos sería limitado. Sin embargo, la investigación durante los últimos años ha revelado que las células que crecían como biofilms tienen propiedades únicas, algunas de las cuales son de significación clínica (Tabla 5.1), por ejemplo, los biofilms pueden ser hasta 1.000 veces más tolerantes de los agentes antimicrobianos que las mismas células que crecen en cultivos líquidos, mientras que las comunidades de las especies que interactúan pueden ser más patógenas que los cultivos puros de los microorganismos constitutivos.

Originalmente, los biofilms eran considerados como acumulaciones densas comprimidas de células, y es-

ta estructura compacta se creyó que era responsable de muchas de las propiedades nuevas de los biofilms. Los avances recientes en el estudio de los biofilms se han realizado a partir de la aplicación de las técnicas nuevas que permiten a los biofilms ser estudiados *in situ* sin ningún proceso de toma de muestras que podrían distorsionar su estructura. Un ejemplo primordial ha sido el uso de la microscopía de exploración confocal láser (MECL) para estudiar la arquitectura del biofilm sin la fijación química o las técnicas de inserción. Las secciones ópticas finas se pueden generar a través de la profundidad del biofilm, y éstas se pueden combinar usando un software de imagen para generar imágenes tridimensionales. Además, la localización de los organismos específicos se puede visualizar inmunológicamente o mediante pruebas de oligonucleótidos, tal como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Fig. 3.3), mientras que otras pruebas moleculares pueden indicar la vitalidad y la actividad metabólica de las células. La MECL se puede también utilizar en combinación con los «reporteros de genes» para identificar los genes que se expresan sola-

**Tabla 5.1** Propiedades generales de los biofilms y las comunidades microbianas

Propiedades generales	Ejemplo de placa dental
Arquitectura abierta	presencia de canales y vacíos
Protección de las defensas del huésped, desecación, etc.	producción de polímeros extracelulares para formar una matriz funcional; protección física para la fagocitosis
Tolerancia aumentada a los antimicrobianos*	reducida sensibilidad a la clorhexidina y antibióticos; transferencia del gen
Neutralización de inhibidores	producción de $\beta$ -lactamasa por células vecinas para proteger a los organismos sensibles
Expresión* del nuevo gen	síntesis de proteínas nuevas en la unión; para la regulación hacia arriba de gtfBC en los biofilms maduros
Respuestas coordinadas del gen	producción de moléculas de señalización de célula-célula (ej. CSP, AI-2)
Heterogenicidad espacial y ambiental	pH y O <sub>2</sub> gradientes; cohesión
Rango de hábitat abierto	anaerobios obligados en un ambiente abiertamente aerobio
Metabolismo más eficiente	catabolismo completo de las macromoléculas complejas del huésped (ej. mucinas) por los grupos microbianos
Virulencia incrementada / sinergismo patogénico en abscesos y enfermedad periodontal	
* una consecuencia de la expresión alterada del gen puede también ser una tolerancia creciente de los agentes antimicrobianos.	

mente cuando las células forman un biofilm. Esta tecnología implica la inserción de un marcador en el cromosoma bacteriano en una fase posterior de un promotor mientras una «señal reconocible» (ej. fluorescencia) es producida cuando se activa el gen.

La aplicación de estas modernas aproximaciones al campo general de la ecología microbiana ha mostrado que los biofilms que se desarrollan en ambientes de bajos nutrientes, especialmente aquellos de hábitats acuáticos, tienen una estructura más abierta de lo que se había predicho en estudios anteriores que empleaban microscopía de electrón.

Los canales han sido observados en los biofilms de las bacterias ambientales, permitiendo potencialmente la limitación del crecimiento de factores tales como los nutrientes y el oxígeno al penetrar más extensamente que lo previamente pensado. Además, el uso de microelectrodos y pruebas químicas han mostrado que los considerables gradientes en los factores claves (pH, potencial redox, etc.) pueden ocurrir en distancias relativamente cortas (algunos micrones, es decir, pocos diámetros de la célula) dentro de los biofilms. Esto produce heterogenicidad espacial y temporal dentro del biofilm, permitiendo a bacterias exigentes sobrevivir en ambientes al parecer hostiles o incompatibles (Tabla 5.1).

Un estilo de vida del biofilm puede afectar a las propiedades de un organismo en más de una forma. En primer lugar, la unión de las células a una superficie puede causar un efecto directo, quizás desencadenando a los «sensores» en la superficie de la célula, y es

pecíficamente induciendo la expresión de un subconjunto de genes. Las bacterias son capaces de sentir su ambiente mediante la unión en la membrana de dos componentes transductores de los caminos de la señal que consisten en un sensor de la histidina kinasa y un regulador de la respuesta. La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ambiental que puede también actuar como patógeno oportunista, por ejemplo, en la fibrosis quística. La unión lleva a la regulación de los genes (algC y algG) implicados en la síntesis de exopolisacáridos (alginato) en el plazo de 15 minutos del contacto inicial de una célula con una superficie. En segundo lugar, el ambiente de crecimiento dentro del biofilm puede diferenciarse perceptiblemente, por lo que se refiere a los factores claves (pH, concentración del oxígeno y del nutriente) comparados con el cultivo planctónico.

Una vez más esto puede resultar en la expresión alterada del gen, de allí a un fenotipo alterado, y como un efecto indirecto del crecimiento en un biofilm. Asimismo, los organismos en un biofilm crecerán más lentamente, debido a una limitación de un nutriente particular o a un pH desfavorable, y éste también afectará a las propiedades de una célula. A menudo, es difícil resolver si algunos cambios fenotípicos observados son debidos a los efectos directos o indirectos de estar en un biofilm. Para la mayoría de los propósitos prácticos, las razones de cualquier cambio son menos importantes que la significación biológica del cambio por sí mismo.

Las bacterias del biofilm son fenotípicamente distintas de las células planctónicas, y un aspecto parti-

cularmente importante es la tolerancia creciente de las células del biofilm a los agentes antimicrobianos. Un ejemplo extremo fue encontrar que la *P. aeruginosa* que crecía en el material urinario del catéter era entre 500-1.000 veces más tolerante al antibiótico, tobramicina, que las mismas células en cultivo líquido (planctónico). Convencionalmente, la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos es determinada en las células crecidas en cultivos líquidos por la medida de la concentración inhibitoria mínima (CIM) o de la concentración bactericida mínima (MBC) contra agentes antimicrobianos relevantes. Dada la sensibilidad disminuida de un organismo en una superficie a los agentes antimicrobianos, se ha discutido que sería más apropiado determinar la concentración inhibitoria del biofilm (BIC) y la concentración aniquiladora del biofilm (BKC) o el biofilm erradicando la concentración (BEC). Hasta ahora, estas propuestas no se han aceptado extensamente, y simplemente no hay métodos comúnmente admitidos por los cuales estas concentraciones podrían ser determinadas.

Los microorganismos pueden llegar a ser resistentes a los antibióticos debido a las mutaciones, a la presencia de bombas que emanan droga y a la producción de enzimas de neutralización, pero incluso los organismos innatamente sensibles llegan a ser aparentemente «resistentes» cuando crecen en la superficie de un biofilm. Los mecanismos detrás de la tolerancia creciente de los biofilms a los agentes antimicrobianos todavía no se entienden completamente; se han propuesto numerosas teorías, la significación relativa o la contribución de cada una puede variar según (a) la edad, la estructura y localización del biofilm y (b) las propiedades químicas del agente. La estructura de un biofilm puede restringir la penetración de un agente antimicrobiano; por ejemplo, los antibióticos positivamente cargados tales como los aminoglicósidos se unirán a los polímeros negativamente cargados que están presentes como parte de la matriz extracelular (teoría de la difusión-reacción). Los agentes pueden también unir e inhibir a los organismos en la superficie del biofilm, dejando las células en las profundidades del biofilm relativamente inafectadas, es decir, el agente es aplacado en la superficie. Según lo indicado anteriormente, los microbios que crecen como un biofilm exhiben un fenotipo nuevo, y una posible consecuencia de esto puede ser una sensibilidad reducida a los agentes antimicrobianos. El blanco de la droga no se puede modificar o expresar durante el crecimiento en una superficie, o el organismo puede utilizar las estrategias bioquímicas alternativas de tal modo que disminuyen el impacto potencial del agente activo. Las células también crecen mucho más lentas en un biofilm maduro y, por consiguiente, son mucho menos susceptibles a los antimicrobianos que

las células de crecimiento rápido. El ambiente en las profundidades de un biofilm puede también ser desfavorable para la óptima acción de algunos agentes antimicrobianos. En biofilms multiespecies, un patógeno susceptible puede ser transformado en resistente si las células vecinas no patógenas producen una enzima de neutralización o de degradación de la droga —esto se refiere a veces como «patogenicidad indirecta»—. Además, los biofilms proporcionan las condiciones ideales para la transferencia de los genes de resistencia, ej. vía plásmidos, entre las células vecinas en cercana proximidad unas de otras (transferencia horizontal del gen).

### BIOFILMS EN LA BOCA

La placa dental fue probablemente el primer biofilm en haber sido estudiado en términos de su composición microbiana o su sensibilidad a los agentes antimicrobianos. En el siglo XVII, Antonie van Leeuwenhoek inició la aproximación de los estudios de los biofilms por la observación microscópica directa cuando reportó sobre la diversidad y los altos números de los «animáculos» presentes en las «raspaduras» tomadas alrededor de los dientes humanos. También condujo estudios tempranos en las nuevas propiedades de las células de superficie crecidas cuando fracasó en la aniquilación de las bacterias de la placa en sus dientes mediante el enjuague prolongado con vino-vinagre, mientras que los organismos «fueron aniquilados» si primero se removían de sus molares y mezclados con el vinagre *in vitro*.

La placa dental es uno de los mejores biofilms estudiados, y exhibe todas las características de un biofilm típico (Tabla 5.1). Comparada a otros hábitats, la placa dental es relativamente accesible para el muestreo, y puede incluso crecer mucho en las superficies removibles para la investigación y la experimentación subsiguientes en el laboratorio (modelos *in situ*; Cap. 4). Una gran proporción de los microorganismos dominantes puede ser identificado, mientras que el fenotipo de tales microbios (adhesinas, potencial metabólico, interacciones de la célula-célula) está bien caracterizado. Los biofilms extensos también se desarrollan en las prótesis y la lengua. En otras superficies de la mucosa, las bacterias se fijan a las células epiteliales y pueden desarrollar un fenotipo asociado a la superficie, pero los biofilms extensos en 3 dimensiones no se desarrollan usualmente. Otro biofilm dentalmente relevante se desarrolla en la tubería usada en el sistema de abastecimiento del agua en la unidad dental (DUWS); esto será discutido en el Capítulo 12 (véase Fig. 12.6), pero los principios que gobiernan la formación y las propiedades de estos biofilms serán similares a los descritos más abajo para la placa dental.