

Descripción del papel de *Pseudomonas aeruginosa* en la formación del biofilm dental en los tejidos duros

Diana Marcela Ortiz¹
 Manuela Cardona Roldan¹
 Luciana Gómez Saavedra¹
 José Miguel Tarazona¹
 Luis Eduardo Gonzalez¹
 Julio Cesar Osorio²

Resumen

La enfermedad periodontal es una infección producida principalmente por bacterias anaerobias gram negativas que crecen dentro del surco gingival, donde su factor de virulencia la convierte en una enfermedad crónica caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del diente y es el resultado de la respuesta inflamatoria local y sistémica del huésped susceptible, motivado por la liberación de productos bacterianos específicos de la placa dental. Esta flora microbiana puede ser de vida libre o planctónica y principalmente se organiza en un consorcio específico de microorganismos denominados biofilm. Estos interactúan con el uso de diversas matrices extracelulares ayudando a la formación de caries dental. Estas bacterias del biofilm se relacionan con las secreciones salivales, otros grupos bacterianos y los carbohidratos obtenidos por la ingesta de alimentos. El Biofilm es una asociación organizada y multidimensional de microorganismos coexistentes dentro de una matriz extracelular polimérica compuesta por polisacáridos, proteínas, sales minerales, ADN y otros restos celulares, la cual constituye aproximadamente de un 10% a un 20 % del biofilm. El objetivo de esta revisión temática es describir la colonización microbiana de *Pseudomonas aeruginosa* y su participación en la formación del Biofilm dental.

Palabras Clave: Placa bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*, enfermedades periodontales.

Description of the role of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm formation in dental tissues

Abstract

Periodontal disease is an infection produced mainly by gram-negative anaerobic bacteria that grow within the gingival sulcus, where their virulence factor turns it into a chronic disease characterized by the destruction of the supporting tissues of the tooth and is the result of the local and systemic inflammatory response of the susceptible host, motivated by the release of specific bacterial products from the dental plaque. This microbial flora can be free-living or planktonic and is mainly organized in a specific consortium of microorganisms called biofilm. These interact with the use of various extracellular matrices aiding in the formation of dental caries. These biofilm bacteria are related to salivary secretions, other bacterial groups and carbohydrates obtained from food intake. Biofilm is an organized and multidimensional association of coexisting microorganisms within a polymeric extracellular matrix composed of polysaccharides, proteins, mineral salts, DNA and other cellular debris, which constitutes approximately 10% to 20% of the biofilm. The objective of this review is to describe the microbial colonization of *Pseudomonas aeruginosa* and its participation in the formation of dental biofilm.

Keywords: Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Periodontal diseases.

Recibido: Nov 2021. Aceptado: Dic 2021. Publicado: Dic 2021

Citación:

Ortiz DM, Cardona M, Gómez L, Tarazona JM, Gonzalez LE, Osorio JC. Descripción del papel de *Pseudomonas aeruginosa* en la formación del biofilm dental en los tejidos duros. *Journal Odont Col*. 2021;14(28):41-48

1. Estudiantes de II Semestre de Odontología. Institución Universitaria Colegios de Colombia - UNICOC
2. Biólogo, Magíster en ciencias Maestría Ciencias-Biología, Doctorado Ciencias Biomédicas. Docente Institución Universitaria Colegios de Colombia - UNICOC

Autor responsable de correspondencia: Julio César Osorio
 Correo electrónico: jcosorio@unicoc.edu.co

Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es una infección crónica producida principalmente por bacterias anaerobias gram negativas que crecen dentro del surco gingival. Existen diversos factores genéticos, ambientales y biológicos, entre otros, que pueden favorecer la evolución de la enfermedad a un proceso destructivo de la unidad gingivo - periodontal. Esta enfermedad, es un proceso producto de ciertas bacterias con actividad inflamatoria proveniente de la placa subgingival. Esta relación entre las bacterias y los mecanismos de respuesta inmune del hospedador es la base del mecanismo inmunopatológico del daño tisular. Las bacterias y sus productos estimulan a las células del huésped para que liberen mediadores inflamatorios como las citoquinas y prostaglandinas, las cuales exacerban el daño o destrucción de tejidos periodontales. Existe evidencia científica de la presencia en bolsas periodontales de *P. aeruginosa* donde se considera un antígeno que altera la microbiota subgingival.(1)

La presencia de esta bacteria en la EP crónica se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente y es el resultado de la respuesta inflamatoria local y sistémica del huésped. Esta respuesta inmunológica es motivada por la liberación de productos bacterianos específicos, que puede dificultar el control de la enfermedad periodontal, además de incrementar el riesgo de infecciones oportunistas, especialmente en los pacientes inmunodeprimidos. Esta flora microbiana puede ser de vida libre o planctónica y principalmente se organiza en un consorcio específico de microorganismos denominados biofilm. *P. aeruginosa* interactúa con sus diversas matrices extracelulares lo que permite la progresión a la formación de caries dental. Estos microorganismos denominados biofilm intervienen con las secreciones salivales, cepas bacterianas y los carbohidratos de los nutrientes. Según el análisis de diferentes estudios experimentales la EP está ampliamente distribuida en el mundo y afecta aproximadamente al 48% de la población adulta. Cuando la EP está en una fase avanzada puede causar pérdida de una o varias piezas dentales, lo que afecta la función y estética, impactando en la calidad de vida de los pacientes. (2)

El Biofilm es una asociación organizada y multidimensional de microorganismos coexistentes dentro de una matriz extracelular polimérica compuesta por polisacáridos, proteínas, sales minerales, ADN y otros restos celulares, la cual constituye aproximadamente de un 10% a un 20 % del biofilm; cabe resaltar que en la biopelícula dental las células se encuentran irreversiblemente adheridas a una substrato; este hallazgo fue evidenciado por primera vez por Antonie Van Leeuwenhoek a través de un microscopio de luz. Es importante mencionar que el biofilm dental está conformado por bacterias que poseen continuidad temporal y comúnmente se encuentran relacionadas a agentes patógenos donde su formación determinará un proceso progresivo en el que se evidencian efectos dañinos relacionados con la presencia y desarrollo de enfermedades de la cavidad oral. Actualmente se han descubierto cepas multiresistentes de *P. aeruginosa* que representan un peligro

para la salud general de los pacientes, contiene entre sus principales factores de virulencia, elevada resistencia a los antibióticos, y entre ellos a los utilizados como coadyuvantes del tratamiento periodontal. Otro factor de virulencia importante de esta bacteria es la capacidad de producir y secretar potentes toxinas y enzimas extracelulares; además, suprime la proliferación de linfocitos y es altamente invasiva, capaz de adherirse y formar biofilms en tejidos y superficies duras. (3)

La formación de biopelículas se produce en muchos pasos donde se requiere un tipo especial de señalización, conocida como detección de quórum, entre las células del microorganismo, pero algunas investigaciones han afirmado que su formación inicial es la unión a las superficies estableciendo colonias, maduración y formación de biopelícula y, finalmente desprendimiento y dispersión de la biopelícula. Además, requiere la transcripción de diferentes conjuntos de genes en comparación con los de las formas planctónicas de los mismos organismos microbianos.

La bacteria es reconocida por su versatilidad metabólica, ya que pueden reproducirse en una variedad de condiciones y no necesitan ningún factor de crecimiento orgánico. En este artículo se describirá la expresión y participación de *P. aeruginosa* siendo una de las bacterias oportunistas que altera los tejidos blandos y duros de la cavidad oral. (4)

Marco teórico

El descubrimiento del género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez a finales del siglo XIX por el profesor Walter Migula del Instituto Karlsruhe en Alemania. Seguido a ello el término “aeruginosa” surgió del investigador Schroeter en el año 1872, este término hacía alusión a los colores que la bacteria que mostraba en ciertas condiciones de cultivo, un color similar como el cobre oxidado, y un verde-azulado. Schroeter publicó que esto era debido a un pigmento soluble en agua, del cual posteriormente se hablaría como pio-cianina. La especie de *P. aeruginosa*, antes fue nominada *Bacillus pyocyaneus*, fue aislada primeramente por Carle Gessard en 1882, tras varios años, se estableció que *P. aeruginosa* es la nomenclatura oficial para poder asignar a esta especie bacteriana debido a su homogeneidad fenotípica, así a lo largo de los años, esta clasificación fue cambiando a aspectos más fisiológicos, como los factores de patogenicidad para llegar a una clasificación más precisa. Sin embargo; la definición de *Pseudomonas* como bacterias gramnegativas, aeróbicas, que no esporulan, con movilidad por flagelos polares, no hacía diferencia significativa con otras bacterias gramnegativas. Fue entonces cuando Stanier propuso una nueva clasificación taxonómica de este género basándose en el perfil metabólico de 267 especies sobre 146 metabolitos, lo que con los experimentos de identificación mediante ADN aclararon la clasificación fenotípica. Finalmente, Palleroni en 1973 reporta la clasificación genotípica basada en la secuenciación de la subunidad 16S ARNr, en la que se analizó y dividió al género *Pseudomonas* en cinco subgrupos y sólo las especies más representativas del grupo

uno estarían dentro del género original. En el siglo XVII, Antoine Von Leeuwenhoek, observó por primera vez un tipo de criatura en sus propios dientes siendo un descubrimiento considerado como una biopelícula. (5)

Características morfológicas

P. aeruginosa es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado con forma de bastón y es Gram negativo de 0,5-1 μm en diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Se evidencia por producir una variedad de pigmentos, como la piocianina color azul verdoso, la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo). Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones.

Toxina y efectos

Con respecto a sus efectos tóxicos, su patogenicidad se dice que está determinada por algunos factores de virulencia, los que dependen de la cepa y entre estos se pueden destacar los pili, el flagelo, la matriz de polisacáridos, los pigmentos, las elastasas, las proteasas alcalinas, las lectinas solubles, la fosfolipasa C y diversas toxinas, algunas de las cuales se indican a continuación: - Endotoxina: Responsable de la estimulación excesiva del sistema inmunitario, puede provocar shock séptico y producir la muerte. - Exotoxina A: Citotóxica. Inhibe la síntesis proteica celular, es responsable de necrosis tisular y afecta la respuesta del hospedador a la infección. - Exoenzima S (ExoS) // Exoenzima T (ExoT): Citotóxica. Facilita la adhesión de la bacteria a las células epiteliales y la necrosis tisular. - Exoenzima U (ExoU): Citotóxica. Produce lesiones en las células epiteliales, es responsable de bacteriemia e, incluso, de shock tóxico.

Factores de virulencia

La *P. aeruginosa* representan un peligro para la salud general de los pacientes, contiene entre sus principales factores de virulencia, elevada resistencia a los antibióticos, y entre ellos a los utilizados como coadyuvantes del tratamiento periodontal. Otro factor de virulencia importante de esta bacteria es la capacidad de producir y secretar potentes toxinas y enzimas extracelulares; además, suprime la proliferación de linfocitos y es altamente invasiva, capaz de adherirse y formar biofilms en tejidos y superficies dura.

Pili y el flagelo: Son unas de las principales adhesinas que están involucradas en la unión a las células del huésped. El Pili es una estructura que le proporciona movilidad, adherencia a superficies celulares y formación de biopelícula. Otra adhesina es el flagelo el cual contribuye a la colonización y formación de biopelícula.

Moléculas de detección de Quórum

El Quórum es un mecanismo de virulencia que le permite a la *P. aeruginosa* activar la expresión de genes cuando se ha alcanzado una densidad de población al interior del huésped. Esto le confiere control colectivo de los comportamientos de grupos. Este sistema controla la expresión de otros factores de virulencia (como la elastasa, proteasas, exotoxinas y formación de biopelícula) en respuesta a diferentes estímulos externos concediéndole capacidad de adaptación a diferentes nichos. En la actualidad se han descubierto dos sistemas: el QS de Lux1/LuxR y el sistema de señales de quinolonas de *P. aeruginosa*. La importancia de este sistema radica en la capacidad de inducir la formación de biopelícula, la cual le confiere un modo de crecimiento que resulta en colonias de bacterias revestidas por una matriz de biopolímeros que se unen a la superficie de tejidos blandos y duros que están presentes en infecciones crónicas (periodontitis), teniendo como principal función reducir la eficacia de los antimicrobianos al impedir alcanzar su blanco la bacteria. (4)

La bacteria tiene la capacidad de liberar sustancias al medio que le permite diseminarse y colonizar al huésped. Este mecanismo lo lleva a cabo a través de sistemas de secreción como el sistema de Moléculas de secreción tipo I, II, III, y IV. De este sistema se han identificado cuatro tipos de exotoxinas, la EXO-U inductora de apoptosis y necrosis a nivel de fagocitos y parenquimatosos, la EXO-Y que es una denilato ciclasa que genera una alteración a nivel de la membrana de las células epiteliales de la cavidad oral, y finalmente la EXO-T y la EXO-S que a nivel nuclear inhiben la síntesis de ADN afectando la adherencia celular por cambios a nivel del citoesqueleto. Estos sistemas de proteínas efectoras no se encuentran en todas las cepas de este microorganismo.

Desarrollo del biofilm *P. aeruginosa*

La mayoría de las bacterias pueden adherirse a diferentes superficies y formar biopelículas. La biopelícula es un agregado complejo de bacterias encerradas en una matriz autogenerada de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y es una de las estrategias clave para la supervivencia de las especies durante cambios inesperados en las condiciones de vida, como la fluctuación de la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Las bacterias dentro de una biopelícula pueden escapar de las respuestas inmunitarias del huésped y resistir los tratamientos antimicrobianos hasta 1000 veces más que sus contrapartes planctónicas. *P. aeruginosa* es un formador de biopelícula bien conocida como modelo excelente para estudiar la formación de biofilm. Una biopelícula resistente es un arma fundamental para que esta bacteria compita, sobreviva y domine en el entorno polimicrobiano de la cavidad oral, también coloniza eficazmente una variedad de superficies, incluidos materiales médicos (unidades odontológicas, catéteres urinarios, implantes, lentes de contacto etc) y equipos de la industria alimentaria (tanques de mezcla, cubas y tubos). Por lo tanto, una mayor comprensión de la composición y estructura de la biopelícula, y los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia antimicrobiana de las bacterias que crecen dentro

de una biopelícula. Son vitales para el diseño de estrategias efectivas para manejar, prevenir y, lo que es más importante, erradicar las infecciones asociadas a la biopelícula. Se ha demostrado que la matriz de biopelícula de este microorganismo abarca principalmente polisacáridos, ADN extracelular (eDNA), proteínas y lípidos. La matriz, que es responsable de más del 90% de la biomasa del biofilm (Figura 1), actúa como un andamio para la adhesión a superficies bióticas y abióticas y como refugio para bacterias encerradas en condiciones ambientales adversas (antibióticos y respuestas inmunes del huésped). También proporciona un repertorio de bienes públicos que incluyen nutrientes esenciales, enzimas y proteínas citosólicas para la comunidad de biopelículas. La matriz también facilita la comunicación de célula a célula. (3)

Generalmente, las biopelículas de *P. aeruginosa* se pueden desarrollar sobre superficies bióticas, como superficies de la cavidad oral. Numerosas evidencias sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. El desarrollo de la biopelícula se divide en seis etapas distintas.

Etapas I: Las células bacterianas se adhieren a una superficie a través del soporte de apéndices celulares como los flagelos y los pili de tipo IV. El movimiento flagelar restringido se ha implicado en la mediación de la motilidad de contracción y la biosíntesis de exopolisacáridos necesarios para la asociación de superficie. Esta adherencia es reversible. Es evidente a través de los registros de la presencia de proteínas bacterianas específicas y sus cantidades alteradas cuando *P. aeruginosa* detecta y reacciona en respuesta a una superficie determinada.

Etapas II: Las células bacterianas pasan de una unión reversible a una irreversible.

Etapas III: Propagación progresiva de bacterias adheridas a una arquitectura más estructurada, denominada microcolonias. **Etapas IV:** Estas microcolonias se desarrollan aún más en extensas estructuras tridimensionales en forma de hongo, un sello distintivo de la maduración de la biopelícula. **Etapas V:** En el centro de la microcolonia, la cavidad de la matriz se interrumpe a través de la autólisis celular para la liberación de células dispersas seguida de la transición del modo de crecimiento sésil al planctónico para la siembra de espacios no colonizados (**Etapas VI**), lo que permite la biopelícula ciclo para repetir. Recientemente se demostró que la endonucleasa EndA es necesaria para la dispersión de la biopelícula existente mediante la degradación del eDNA.

Etapas VI: Se sugiere que la transición del desprendimiento al crecimiento planctónico implica una etapa distinta del desarrollo de la biopelícula. Estas células, en contraste con las células planctónicas y sésiles, poseen una fisiología distinta y representan la conversión de infecciones crónicas a agudas. Se convierten en un fenotipo planctónico después de

permanecer en una fase de retraso de 2h con niveles reducidos de ploverdina y c-di-GMP intracelular. La regulación al alza de los genes que codifican la virulencia y la regulación a la baja de los genes de absorción de hierro se observaron en la población dispersa (3)

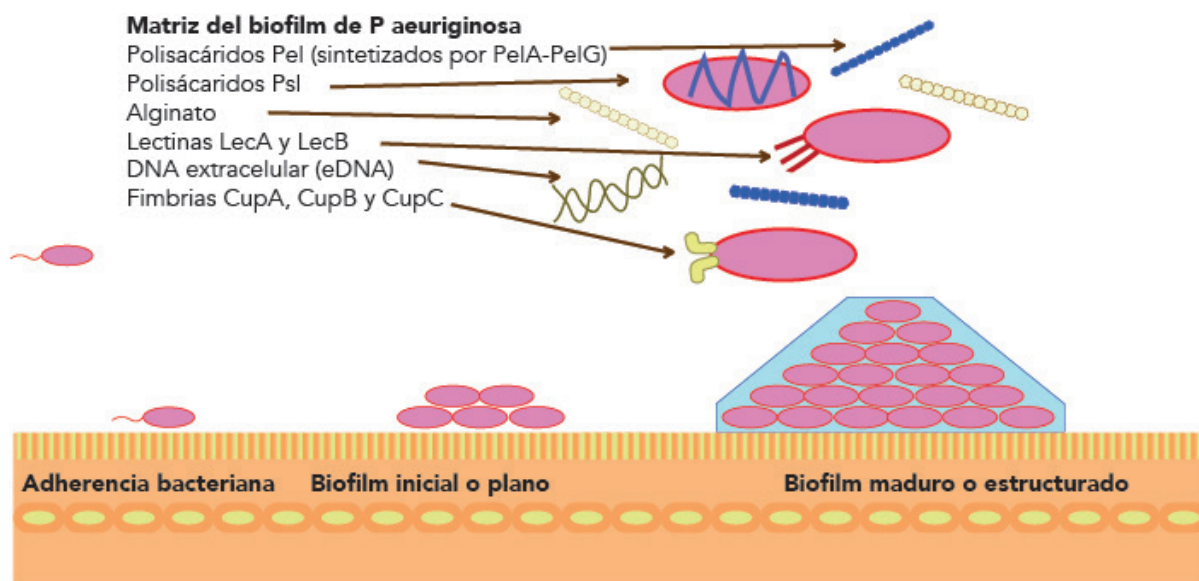


Figura 1. Proceso de formación de la biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa*.

La adherencia bacteriana permite la formación de la biopelícula plana. La biopelícula madura se establece cuando el agregado bacteriano genera la matriz mediante la producción de factores secretados. La producción de la matriz se basa en los polisacáridos Pel y Psl, la proteína alginato y lectinas como LecA y LecB.

Dentro de la cavidad oral, las bacterias permanecen en muy bajas proporciones como microbiota normal. *P. aeruginosa*, una de las especies más patógenas de los seres humanos, posee características invasoras y toxigénicas que le permiten iniciar un proceso infeccioso en tejidos blandos y duros de la flora bucal. Además, la presencia del lipopolisacárido como en los demás Gram negativos, le permite inducir una respuesta inflamatoria por parte del hospedero participando en bolsas de la EP avanzada.

Conclusión

P. Aeruginosa se conoce como una bacteria infecciosa que participa en etapa avanzada de la EP contribuyendo a la formación de Biofilm siendo así un problema que genera daños colaterales a largo plazo, dando como resultado lo que conoce como severidad de la destrucción periodontal que afecta la calidad de vida en los pacientes. Este microorganismo se considera una bacteria resistente oportunista que participa en bolsas periodontales en enfermedades crónicas como la periodontitis, afectando al tejido de la cavidad oral blandos y duros de manera agresiva mediante sus factores de virulencia; se ha demostrado que la bacteria en conjunto con otros microorganismo patógenos puede formar multicolonias en la superficie de las piezas dentales por medio de biofilm y así mismo generar una des-

trucción en el tejido dentario duro induciendo finalmente a la formación de caries dental. Según la revisión temática realizada sugieren que factores como la respuesta del huésped, la composición de microbiota, el acceso a la atención odontológica, hábitos de higiene oral y el tabaquismo pueden ayudar a explicar las correlaciones entre la expresión clínica de la periodontitis y la presencia de bacterias inusuales en las bolsas periodontales. Los tratamientos que se deben llevar a cabo por las infecciones causadas por *P. aeruginosa* aún son denominados un desafío para su control, ya que su capacidad de desarrollo de biopelículas es de formación densa y de igual forma persistente. La complejidad de los tratamientos con antibióticos para las biopelículas de este patógeno es complicada ya que varias especies también participan en la formación de comunidades bacterianas dentro de las biopelículas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Invernizzi-Mendoza CR, Corbeta H. Frecuencia de Pseudomonas aeruginosa en bolsas periodontales de pacientes con Periodontitis Crónica. Mem Inst Investig Cienc Salud [Internet]. 1 de diciembre de 2020;18(3):73-8. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282020000300073&lng=es&nrm=iso&tln-g=es.
2. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R. Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Rev chil infectol [Internet]. abril de 2019;36(2):180-9. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180&lng=en&nrm=iso&tln-g=en.
3. Wu W., Jin Y., Bai F., Jin S. Chapter 41—Pseudomonas Aeruginosa. In: Tang Y.-W., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J., editors. Molecular Medical Microbiology. 2nd ed. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2015. pp. 753–767.
4. Fragozo L, Villalobos C. *Pseudomona aeruginosa*: Estado del arte. Universidad Libre. Facultad de Ciencias de la Salud Especialidad de Medicina Interna. Barranquilla: Colombia. 2016; pág112.
5. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. J Chinese Med Assoc. 2018;81(1):7–11.