



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
AREA ACADÉMICA DE MEDICINA



**“Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento y
formación de biopelícula de microorganismos productores de caries”**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

CARMEN BALDERAS DELGADILLO

Director

DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

Codirector

DR. JOSE LUIS SEBASTIAN FRANCO

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., a 27 de Junio de 2012



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV

I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	2
2.1	<i>Marco Teórico</i>	2
2.1.1	<i>Historia del Electromagnetismo</i>	2
2.1.2	<i>Campo magnético</i>	5
2.1.3	<i>Definición de campo magnético</i>	5
2.1.4	<i>Características de campo eléctrico y magnético</i>	8
2.1.5	<i>Campos electromagnéticos de frecuencias bajas</i>	11
2.1.6	<i>Campos electromagnéticos de frecuencias altas</i>	12
2.2	<i>Efectos biológicos de los campos magnéticos</i>	12
2.2.1	<i>Efectos biológicos de los CEM sobre el crecimiento celular</i>	13
2.3	<i>Análisis de estructuras celulares frente a un campo eléctrico</i>	14
2.3.1	<i>La superficie celular</i>	14
2.3.2	<i>La pared celular</i>	14
2.3.3	<i>La membrana celular</i>	15
2.3.4	<i>El citoplasma</i>	16
2.4	<i>Modelización dieléctrica de células biológicas</i>	16
2.5	<i>Modelización dieléctrica de la bacteria</i>	16
2.6	<i>Simulación de sistemas biológicos por el método de elementos finitos</i>	17
2.7	<i>Staphylococcus aureus como ejemplo de modelo teórico</i>	18

2.8	<i>Biopelículas bacterianas</i>	19
2.8.1	<i>Definición de biopelículas</i>	19
2.8.2	<i>Características y propiedades de biopelículas</i>	19
III	<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	27
IV	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	28
V	<i>HIPÓTESIS</i>	28
VI	<i>OBJETIVOS</i>	29
6.1	<i>Objetivo General</i>	29
6.2	<i>Objetivos Específicos</i>	29
VII	<i>MATERIAL Y MÉTODO</i>	30
7.1	<i>Diseño de Bobina de Helmholtz y equipo para aplicación de CEM</i>	30
7.1.1	<i>Sistema de aplicación de CEM</i>	30
7.1.2	<i>Especificación y dimensión del equipo</i>	30
7.1.3	<i>Fuente de Voltaje</i>	31
7.1.4	<i>Generador de funciones</i>	31
7.1.5	<i>Osciloscopio</i>	31
7.1.6	<i>Circuito amplificador</i>	31

7.2	<i>Estandarización de las condiciones de CEM aplicados a microorganismos productores de caries.</i>	34
7.2.1	<i>Efecto de CEM sobre biopelícula</i>	34
7.3	<i>Estandarización de técnica para formación de biopelícula</i>	34
7.3.1	<i>Método de microplaca</i>	35
7.3.2	<i>Método de rojo congo</i>	35
7.3.3	<i>Selección de cepas productoras de biopelícula</i>	36
7.4	<i>Curva de crecimiento de Staphylococcus aureus(cepa 1654)</i>	37
7.5	<i>Efecto de CEM sobre crecimiento de microorganismos</i>	38
7.6	<i>Efecto de los CEM sobre el crecimiento de S.aureus(cepa 1654)</i>	38
7.7	<i>Determinación del efecto de los CEM sobre la superficie de las bacterias observadas mediante MEB</i>	39
7.8	<i>Efecto de CEM sobre bacterias aisladas de pacientes</i>	42
7.9	<i>Caracterización electromagnética del Staphylococcus aureus</i>	42
7.10	<i>Distribución de campo eléctrico y potencia electromagnética total disipada en Staphylococcus aureus.</i>	45

VIII	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
IX	RESULTADOS	49
9.1	<i>Determinación de la formación de biopelícula por el método de rojo congo</i>	49
9.2	<i>Efecto de los CEM sobre la formación de biopelícula</i>	52
9.3	<i>Determinación de curva de crecimiento de S. aureus</i>	54
9.4	<i>Efecto de los CEM sobre las bacterias productoras de caries</i>	55
9.5	<i>Efecto de los CEM sobre el crecimiento y formación de biopelícula en S. aureus</i>	57
9.6	<i>Elementos presentes en la superficie de S.aureus sometida a tratamiento con CEM (frecuencia de 50 Hz, 5 mT .</i>	58
9.7	<i>Efecto de los CEM sobre la morfología de S.aureus</i>	60
9.8	<i>Efecto de CEM sobre el crecimiento y formación de biopelícula de las cepas bacterianas productoras de caries</i>	61
9.9	<i>Elementos presentes en la superficie de bacterias de la caries sometidas a tratamiento con CEM a frecuencia de 50 Hz y 5 mT</i>	62
9.10	<i>Efecto de CEM sobre S.aureus bajo simulación con el programa COMSOL MULTIPHYSIC</i>	68
9.11	<i>Análisis de la distribución de campo eléctrico</i>	69

X	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
XI	CONCLUSIONES	74
XII	BIBLIOGRAFIA	75
XIII	ANEXOS	86
13.1	<i>Carta de consentimiento informado</i>	

Índice de Figuras

Figura 1.	Espectro electromagnético.....	9
Figura 2.	Eventos en el desarrollo de biopelícula.....	22
Figura 3.	Sistema para aplicación de campos electromagnéticos.....	33
Figura 4.	Sensor de campo magnético.....	33
Figura 5.	Muestras recubiertas con una capa fina de oro para análisis al MEB.....	41
Figura 6.	Ionizador de muestras para observar al MEB.....	41
Figura 7.	Microscopio Electrónico de Barrido.....	41
Figura 8.	Aplicación del modelo teórico a la bacteria	44
Figura 9.	Distribución de campo electromagnético (vectores de campo).....	44
Figura 10	Distribución de campo en toda la bacteria.....	45
Figura 11	Distribución de campo eléctrico en la bacteria con intensidad de campo de 5mT.....	46
Figura 12	Distribución de campo eléctrico en la bacteria con intensidad de campo 18mT.....	46
Figura 13	Mallado adaptativo del sistema y la bacteria.....	47
Figura 14	Cepa 1654 biopelícula(+).	50
Figura 15	Bacterias formadoras o no formadoras de biopelícula.....	50
Figura 16	Presencia de halo hialino de la cepa ATCC (<i>S. aureus</i>).....	51
Figura 17	Cepas formadoras y no formadoras de biopelícula.....	52
Figura 18	Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> (cepa 1654).....	54

Figura19	Microfotografía electrónica de barrido de unabiopelícula <i>S. aureus</i> (grupo control y grupo expuesto).....	57
Figura20.	Cepa bacteriana (1654) expuesta a CEM con frecuencia de 10 kHz y 18 mTy su grupo control y expuesto	59
Figura21	Tinción de Gram, cepa bacteriana 1654 expuesta a CEM a frecuencia de 10 kHz y 18 mT.....	59
Figura 22	Microfotografía electrónica de barrido, cepa 1654 <i>S.aureus</i> (grupo control y expuesta a frecuencia de 50 Hz y 5mT.....	60
Figura 23	Microfotografía electrónica de una biopelícula oral, cocos gram (+) grupo control y expuesto a CEM a frecuencia de 10kHz y 18mT.....	61
Figura 24	Análisis electromagnético a diferente frecuencia.....	68
Figura 25	Variaciones de la amplitud de campo en membrana y en el citoplasma.....	69
Figura 26	Variaciones de la amplitud de campo a diferente frecuencia.....	70

Índice de Tablas

Tabla 1	Equipo utilizado en el desarrollo experimental.....	32
Tabla 2	Cepas bacterianas controles positivos y negativos a biopelícula.....	37
Tabla 3	Parámetros eléctricos (permitividad eléctrica y conductividad).....	43
Tabla 4	Resultados de cepas que dieron positivo y negativo a formación de biopelícula, Biopelícula (+) forma biopelícula ; Biopelícula(-) No formabiopelícula.....	49
Tabla 5	Efecto de los CEM sobre formación de biopelícula.....	53
Tabla 6	Valores de la curva de crecimiento bacteria 1654 de <i>S. aureus</i>	55
Tabla 7	Se observa que 9 de las 20 cepas, es decir el 45 % son afectadas por los campos electromagnéticos de manera significativa.....	56
Tabla 8	Valores de la curva de crecimiento bacteria 1654 de <i>S. aureus</i>	58
Tabla 9	Análisis de elementos presentes en la superficie del <i>S. aureus</i> al ser expuesta a CEM a frecuencia de 50 Hz, 5 mT.....	62
Tabla 10	Análisis de elementos de las bacterias de la caries expuestas a campos electromagnéticos a frecuencia de 10 kHz 18mT	63
Tabla 11	Análisis de elementos de la bacteria 1654 expuesta a CEM.....	64
Tabla 12	Cambio en la morfología de la bacteria cuando esta se expone a frecuencia de 10kHz y 18mT en una imagen de 10 000 X.....	65
Tabla 13	Microfotografía electrónica de barrido a diferente resolución (X10 000, X 5000 y X 2500 del grupo control y expuesto a CEM en las bacterias productoras de caries.....	67

ABREVIATURAS

AC	Corriente alterna
A	Amperio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A/m	Amperios por metro
BHI	Infusión cerebro y corazón, del inglés "Brain Heart Infusion"
CEM	Campos electromagnéticos
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELF	"Extremely low frequency"
Elisa	Acrónimo del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
σ	Conductividad
ϵ	Permitividad
E	Campo (vector) V/m
FI	Frecuencia intermedia
FEB	Frecuencia eléctrica baja
FEM	<i>Finite Element Method</i> (Método de elementos finitos)
G	Gauss
gr	Gramo
GHz	Gigahertz
h	Horas
H	Campo (vector) A/m
Hz	Hertz ó hercios
IIH	Infecciones intrahospitalarias
J	Densidad de corriente A/m²

kHz	Kilohertz
l	Litros
MHz	Megahertz
min	Minuto
ml	Mililitro
mT	Militesla
MEB	Microscopio electrónico de barrido
mF/m²	Microfaradios por metro cuadrado
NaCl	Cloruro de sodio
Nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
Oe	“Oersted”
PIA	Adhesina intercelular polisacarida
PBS	“Phosphate buffer”
Ph	Indicador de la acidez de una sustancia
Rojo congo	Colorante
Rpm	Revoluciones por minuto
RF	Radio frecuencia
SPE	Sustancia polimérica extracelular
SSINaCl	Sólución isotónica de cloruro de sodio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	Tesla
SEM	Scanningmicroscopeelectronic
TMP	Potencial transmembrana
TSA	Agar soya tripticaseína
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltaje
V/m	Voltios por metro
W/m	Densidad de energía
W/m²	Potencia incidente por unidad de superficie

μl	Microlitro
μT	Microtesla
μm	Micrómetro
mS/m	miliSiemens por metro
Ωm	ohmios por metro
$\sigma/\omega\varepsilon$	Constante dieléctrica

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas cada vez son más difíciles de combatir por lo que se requieren de nuevos métodos alternativos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los campos electromagnéticos (CEM) sobre la formación de biopelícula y crecimiento de bacterias productoras de caries. Para ello se construyó una bobina de Helmholtz que genera intensidades de CEM de 1 mT a 18 mT con frecuencia que osciló entre 10 Hz hasta 10 kHz y tiempos de exposición de 1 seg. a 36 horas. Como microorganismo fue utilizado para estandarizar las condiciones del CEM la cepa 1654 de *S.aureus* aislada de un paciente con oftalmia. Una vez estandarizadas las condiciones de aplicación de CEM se aislaron bacterias de pacientes con caries. La presencia de biopelícula se determinó sembrando las bacterias en agar BHI con rojo congo, y el crecimiento de las mismas se determinó en caldo nutritivo, registrando la curva de crecimiento mediante la absorbancia del medio; y a nivel celular se registró la variación de elementos en la superficie de las bacterias mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados indicaron eliminación de biopelícula y retraso en el crecimiento de bacterias, de *S. aureus* como de bacterias productoras de caries, lo cual se alcanzó a una intensidad magnética de 18 mT, 3 A y 10 kHz. De igual manera se observó que para el caso de *S. aureus* se presenta una movilización de hierro, calcio y sodio cuando se aplican los CEM. Lo anterior permite concluir que los CEM son una nueva alternativa de control de crecimiento de microorganismos productores de caries.

ABSTRACT

The infectious diseases are more difficult to fight each time that's why it is needed new alternative methods. The aim of this work was to determine the effect of the electromagnetic fields (CEM) in the formation of biofilm and growth of bacteria producer of tooth decay.

For this reason, it was built a coil that generates CEM strength from 1 to 18mT with a frequency ranged from 10 Hz to 10 kHz and exposure time between 1 second to 36 hours; and as a test microorganism, the strain 1654 of *S. aureus* isolated from a patient with ophthalmia. Once standardized the conditions of application of CEM bacteria, were isolated bacteria from patients with cavities. The presence of biofilm was determined planting the bacterium in agar BHI- Congo red, and the growth was determined in culture medium BHI, registering the absorbance by turbidimetry; and in a cellular level the variation of elements in the surface of bacteria by scanning electronic microscopy. The results show elimination of biofilm but a delay in the growth of bacteria, both *S. aureus* and bacteria producer of tooth decay, which was obtained with a magnetic strength of growth of 18 mT, 3 ampers and 10 kHz. In the same way, it was observed in the *S. aureus* case is presented a mobilization of iron, calcium and sodium when is applied CEM. It is concluded the CEM are a new alternative to control of microorganism growth producer of tooth decay.

Palabras clave: **Campos electromagnéticos, biopelícula, crecimiento microbiano**

Key words: **Electromagnetic field, biofilm, microbial growth**

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad el control de infecciones bacterianas sigue siendo un gran problema de salud pública entre otras razones porque los microorganismos crean mecanismos de defensa (resistencia), frente a los antibióticos o porque se modifican sus factores de virulencia por lo que el ser humano a tratado de crear nuevas alternativas para su control y eliminación. Por otro lado se ha observado que el tratamiento con campos electromagnéticos puede mejorar la salud de la gente; es posible que la aplicación de CEM actúe sobre los microorganismos y al respecto varios estudios señalan que la aplicación de CEM de baja frecuencia podrían inhibir el desarrollo de bacterias como *Escherichiacoli* y *S.aureus* de estas dos *S. aureus* es de gran importancia médica ya que produce gran variedad de enfermedades al humano. Estudios indican que esta bacteria podría llegar a ser inhibida a través de CEM sin embargo en otros estudios se muestra que es difícil alcanzar la inhibición de microorganismos. Existen enfermedades causadas por bacterias que son altamente frecuentes en nuestra población y por tanto difícilmente controlables como es la caries, un padecimiento que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por ácidos, en particular ácido láctico, producido por la fermentación de los carbohidratos de la dieta por los microorganismos bucales, dentro de los microorganismos que más frecuentemente producen caries se encuentran los del grupo de *Streptococcusmutans*, *S.sobrinus*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *actinomyces* y *lactobacillus* entre otras, son bacterias con características que comparten con *S. aureus*. Por lo anterior este proyecto tuvo como objetivo principal aplicar CEM a bacterias productoras de caries utilizando como modelo estándar y comparativo una cepa de *S. aureus* causante de enfermedad humana determinando su curva de crecimiento, capacidad de producción de biopelícula y caracterización de iones en su superficie celular y de igual modo a bacterias productoras de caries en pacientes voluntarios.

II ANTECEDENTES

2.1 Marco teórico

2.1.1 Historia del electromagnetismo

Históricamente: el nombre de magnetita viene de la ciudad de magnesia de Asia menor y fueron los griegos los primeros que tienen testimonios escritos sobre este mineral. Wood,[Wood R. 1991]señala que en los tiempos de Tales de Mileto (640-546 a. C.), el hombre hablaba de atracciones magnéticas. Desde hace más de dos mil años, los chinos utilizaron la brújula magnética para orientarse en sus viajes marítimos y por los desiertos de Mongolia. Como es sabido, el fundamento de la brújula es adoptar una orientación, la cual está dada por un campo magnético periférico.

El concepto actual del electromagnetismo tiene su origen en diferentes experimentos desarrollados principalmente durante el siglo XIX, en los cuales se planteó la unificación de las teorías sobre la electricidad y el magnetismo. Antes de este planteamiento los fenómenos eléctricos y magnéticos habían sido tratados por separado, habiéndose desarrollado teorías desde la antigua Grecia; sin embargo no fue hasta los últimos años del siglo XVI cuando se realizaron los primeros descubrimientos de frotación de distintos materiales.

Ya en tiempos modernos, el físico danés Hans Christian Oersted, en 1820, observó que la orientación de la aguja de una brújula puede cambiar por la acción de una corriente eléctrica de forma semejante a como lo hacía un imán. Esto lo llevó a pensar que alrededor de un conductor de electrones se forma un campo que se manifiesta como un imán, de esta manera se relacionó el magnetismo con la electricidad (Galar-Castelan I. 1988).

Por otro lado, los campos electromagnéticos pueden usarse para inhibir el crecimiento de microorganismos, lo que se presenta como posibilidad para la conservación

de alimentos, al eliminar los microorganismos presentes en ellos y que pueden alterarlos (Gerencser et al., 1962; Van Nostran et al., 1967; Pothakamury et al., 1993; Mertens y Knorr, 1992; Dallas, 1997).

Los mecanismos por los cuales los campos magnéticos afectan el desarrollo de los microorganismos están sin esclarecer, pero se interpreta que se desarrollan por efecto sobre la membrana plasmática, con posibles repercusiones metabólicas y acción directa sobre las partículas coloidales del medio de cultivo. Se han propuesto varias teorías para explicar el efecto de los campos magnéticos débiles sobre los organismos y todas hacen mención de un fenómeno denominado resonancia del ciclotrón, como uno de los responsables de dichos efectos (Liboff, 1985; Pothakamury et al., 1993; Goldsworthy et al., 1999). Los campos magnéticos pueden activar las partículas coloidales del medio de cultivo haciendo que éstas remuevan parte del **Ca** unido a los fosfolípidos de la membrana plasmática, incrementando su permeabilidad y de esta forma, afectando el crecimiento de los microorganismos (Goldsworthy et al., 1999).

Toda partícula como consecuencia de sus propiedades eléctricas y magnéticas experimenta fuerzas y torques al encontrarse bajo la acción de campos electromagnéticos. Cuando las partículas son células biológicas, su comportamiento ante el campo electromagnético puede revelar valiosa información sobre su estructura, morfología y fisiología.

A principios del pasado siglo, entre los años 1910 y 1913, el médico alemán Höber, muy interesado en la fisiología de la membrana celular, llevó a cabo experimentos dieléctricos con eritrocitos con el fin de estudiar sus propiedades eléctricas (Höber 1912). Pudo observar que a una frecuencia de 1 kHz una suspensión de eritrocitos presentaba una resistividad de $1200\Omega\text{m}$, y que aumentando la frecuencia a 10 MHz, la resistividad disminuía hasta $200\Omega\text{m}$. Advirtió también que la resistividad que presentaban células hemolizadas (rotas) a bajas frecuencias era muy similar a la medida de altas frecuencias en las células íntegras. Llegó a la conclusión de que en altas frecuencias no hay diferencia entre células íntegras y células destruidas, dado que en el primer caso se mide la resistividad de la solución interna y en el segundo la de la solución externa, siendo ambas electrolitos concentrados. De este modo se empezó a considerar que, eléctricamente, las

células estaban caracterizadas por un citoplasma de baja resistencia, rodeado por una membrana muy poco conductora. Asimismo, se introdujeron los conceptos de capacidad específica de la membrana y la variación de su impedancia con la frecuencia de la señal eléctrica. A partir de ahí, posteriores investigaciones corroboraron los resultados obtenidos por Höber.

En 1921 Phillipson, basándose en las medidas que llevó a cabo con eritrocitos, músculo esquelético e hígado, estableció que un circuito eléctrico funciona igual que la membrana plasmática de las células, interpretó los resultados con el circuito de resistencia y capacidad en paralelo -representando la membrana- a la que añadió una resistencia en serie -el citoplasma- (Phillipson 1921). En 1922, Osterhout medía la conductividad de la membrana del alga marina *Laminaria* a 1 kHz y atribuyó su bajo valor cuando estaba viva a la escasa permeabilidad iónica de la membrana ya que después de muerta tenían la misma conductividad que el agua de mar (Osterhout 1922).

En 1925, Roger y Cole confirman las propiedades capacitivas de la membrana observadas por Höber en los eritrocitos, pero estudiando ahora los huevecillos del erizo de mar *Arbacia punctulata* (Rogers y Cole 1925). Se iban definiendo con claridad las características eléctricas de la célula viva; en su interior está compuesta por una solución iónica y una capa impermeable poco conductora.

Posteriormente, las numerosas investigaciones en el campo de las propiedades dieléctricas de las células biológicas y en su interpretación mediante modelos de capas comenzaban a asentar las bases de la técnica conocida como espectroscopía dieléctrica ó de impedancia. Fricke desarrolló el modelo para una célula esférica rodeada por una fina capa de baja conductividad (Fricke 1925), que posteriormente amplió para incluir el modelo multi-capas (Fricke 1953) y geometrías elipsoidales.

Fricke desarrolló el modelo para una célula esférica rodeada por una fina capa de baja conductividad (Fricke 1925), que posteriormente, amplió para incluir el modelo multi-capas (Fricke 1953) y geometrías elipsoidales (Fricke 1955). Cole, con su trabajo durante la década de 1920 hasta 1940, hizo una gran contribución a la medida e interpretación del espectro dieléctrico en general, así como al de las suspensiones celulares y tejidos (Cole y

Cole 1941; Cole 1972).Schwan, entre otros, aportaba los conocimientos extraídos de su indagación sobre los fenómenos dispersivos de los materiales biológicos en base a las teorías de Maxwell y Wagner (Bothwell y Schwan 1956; Schwan 1957).

A mediados del siglo pasado, paralelamente al desarrollo de la espectroscopía de impedancia, se observó la interacción de la materia con campos eléctricos no uniformes. Los efectos provocados por la no uniformidad del campo estaban ya presentes en las observaciones recogidas por el filósofo Tales de Mileto cerca del año 600 a.C., en lo que se considera el descubrimiento de la electricidad. El trozo de ámbar que después de haber sido frotado con un paño atraía pequeñas partículas de otros materiales, lo hacía porque había sido cargado y a su alrededor había un campo no uniforme. Muchos siglos después, en el año 1600, fue nuevamente señalado un fenómeno similar por el médico Gilbert en su tratado sobre el magnetismo “*De magnete, magneticisque corporibus*”, tras observar el cambio de forma de las gotas de agua cerca de ámbar electrificado. Sobre la atracción que ejercían los campos eléctricos en la materia orgánica tal vez se pensó que poco más había que añadir después del desarrollo teórico de Maxwell llevó a cabo sobre los efectos electromagnéticos en el siglo XIX. Sin embargo, fue en 1951 cuando el científico Pohl acuñaba el término de dielectroforesis para denominar dichos fenómenos, recogiendo en aquél descripción del fenómeno observado en el que partículas dieléctricas (*dielectro*) dichos fenómenos, recogiendo en aquél la descripción del fenómeno observado en el que partículas dieléctricas (*dielectro*) respondían con un movimiento (*phoresis*, en griego) a la acción de un campo eléctrico no uniforme (Pohl 1951). La dielectroforesis es diferente a la electroforesis, en éste una partícula con carga neta responde con un movimiento a un campo eléctrico dentro de una solución salina.

2.1.2 Campo magnético

2.1.3 Definición de campo magnético

Un campo magnético se define como la región en el espacio en el que un objeto magnetizado puede, a su vez magnetizar a otros cuerpos. De acuerdo a la distribución de su intensidad se puede clasificar en:

1. **Homogéneos:** en donde la intensidad del campo es uniforme.
2. **Heterogéneos:** en donde la intensidad disminuye proporcionalmente con la distancia del centro.

Y de acuerdo a si son constantes o variables en el tiempo se clasifican en:

1. **Estáticos:** las líneas de fuerza y su dirección son constantes en el tiempo.
2. **Oscilantes:** la carga se alterna en cada impulso a la vez que la intensidad también varía.

Tomando en cuenta ambos criterios de clasificación, el efecto de los campos magnéticos sobre los diversos sistemas biológicos dependerá de si éste es homogéneo, heterogéneo, estático u oscilante (Pothakamury U.R., B.J. Barletta, G.V. Barbosa y B.G. Swanson 1993).

Por otro lado, un campo eléctrico se origina por cargas eléctricas estáticas. Cuando el campo magnético y eléctrico en una región determinada varían en el tiempo, ambos se relacionan de tal manera que todo campo eléctrico que varíe con el tiempo, siempre va acompañado de un campo magnético también variable y viceversa, por lo tanto, el así llamado campo electromagnético, es resumido por (Parker S.P. 1993), como la interrelación entre campo eléctrico y magnético en una sola entidad física.

Según Stewart J.R.1979, en general para la transmisión de corriente alterna (A.C.), en Norteamérica, la frecuencia es de 60 Hz y para Europa y otras regiones, es de 50 Hz, entendiéndose por *frecuencia* el número de ciclos completos por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional de Unidades 1 ciclo/ seg. equivale a 1 Hz.

Por otra parte, en un campo magnético la fuerza está dada por la densidad de flujo magnético (también llamada *intensidad magnética*), siendo esta el número de líneas de fuerza que pasan por unidad de área. La unidad en el sistema sexagesimal para la intensidad magnética es el "Oersted" (**Oe**) establecido en 1932 por acuerdo internacional, como sustituto de Gauss (**G**); aunque sigue utilizándose más éste último en la literatura. Para el

Sistema Internacional de Unidades de densidad de flujo magnético está dada en *Teslas (T)*, en donde cada T equivale a 10,000 G (Galar-Castelan I. 1988).

A su vez, la intensidad de un campo magnético depende no solo de una variable eléctrica, sino además de la distancia, su magnitud se relaciona directamente con el flujo de corriente (medido en amperes) y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia. En forma similar, la magnitud del campo eléctrico está en proporción directa al voltaje y decrece conforme la distancia aumenta (Hewitt 1998).

La electricidad es una parte esencial en nuestras vidas, alimenta la mayoría de los equipos que los ciudadanos utilizan habitualmente haciéndonos la vida más sencilla. La electricidad se produce a frecuencias de 50 Hercios o ciclos por segundo (un hercio es la frecuencia de una partícula que sufre una oscilación en un período de un segundo). En el espectro electromagnético se denotan por ELF (ExtremlyLowFrequency). Los campos eléctrico y magnético se denotarán por **CEM**.

En física, el magnetismo es un fenómeno por el que los materiales ejercen fuerzas de atracción o repulsión a otros materiales. Hay algunos materiales conocidos que han presentado propiedades magnéticas detectables fácilmente como el níquel, hierro y sus aleaciones que comúnmente se llaman imanes. El magnetismo tiene otras manifestaciones en física, particularmente como uno de los dos componentes de la onda electromagnética, como por ejemplo la luz.

Los campos eléctricos y magnéticos son líneas invisibles de fuerza que rodean cualquier dispositivo eléctrico. Las líneas de fuerza, las instalaciones eléctricas y los equipos eléctricos producen CEM de baja frecuencia o ELF.

Un campo eléctrico es un campo de fuerza creado por la atracción y repulsión de cargas eléctricas y se mide en Voltios por metro (V/m).

Los campos eléctricos (también conocidos como campos electrostáticos) son campos eléctricos que no varían con el tiempo (frecuencia de 0 Hz). Los campos eléctricos estáticos se generan por cargas eléctricas fijas en el espacio, y son distintos de los campos que

cambian con el tiempo, como los campos eléctrico magnéticos generados por electrodomésticos, que utilizan corriente alterna (AC) o por teléfonos móviles, etc.

2.1.4 Características de campos eléctrico y magnético

Los campos eléctrico y magnético pueden ser caracterizados por su longitud de onda, su frecuencia y su amplitud (que viene a determinar su intensidad o potencia). La dirección del campo alterna de una polaridad a la contraria y vuelta a la primera en un intervalo de tiempo se llama período. Por lo que se dice que la onda ha hecho un ciclo. Si la onda alterna su polaridad una vez en un ciclo se dice que su frecuencia es de un ciclo por segundo, y se denomina Hercio en honor al físico alemán Heinrich Rudolf Hertz y se denomina Hz. Por lo que la frecuencia del campo se mide en hercios (Hz), lo cual describe el número de ciclos que ocurren en un segundo. Elhercio, hertzio o hertz (símbolo Hz), es la unidad de frecuencia del Sistema Internaciones de Unidades. Un hercio representa un ciclo por cada segundo, entendiendo *ciclo* como la repetición de un suceso. El hercio se aplica en física a la medición de la cantidad de veces por un segundo que se repite una onda (ya sea ésta sonora o electromagnética), magnitud denominada frecuencia y que es, en este sentido, la inversa del período.

Los campos electromagnéticos estáticos y de baja frecuencia (ELF) que podemos decir ocupan la parte del espectro electromagnético entre 0 y 3 kHz.

Espectro Electromagnético es un conjunto de ondas electromagnéticas que se propagan de manera ondulatoria y con velocidad constante, por ejemplo la luz aproximadamente 300.000 Km/s. Las ondas electromagnéticas se dividen en luz visible, infrarroja, ultravioleta, rayos X, rayos gama, radiofrecuencia y microondas. Cada onda se diferencia en la frecuencia (número de vibraciones en la unidad de tiempo) y la longitud (distancia entre dos ondas sucesivas). Frecuencia y longitud de onda son inversamente proporcionales, por esto su producto siempre es constante e igual a la velocidad de la luz.

Cada función de onda lleva asociada una energía, por tanto a mayor frecuencia mayor es la energía transportada (ver Figura 1).

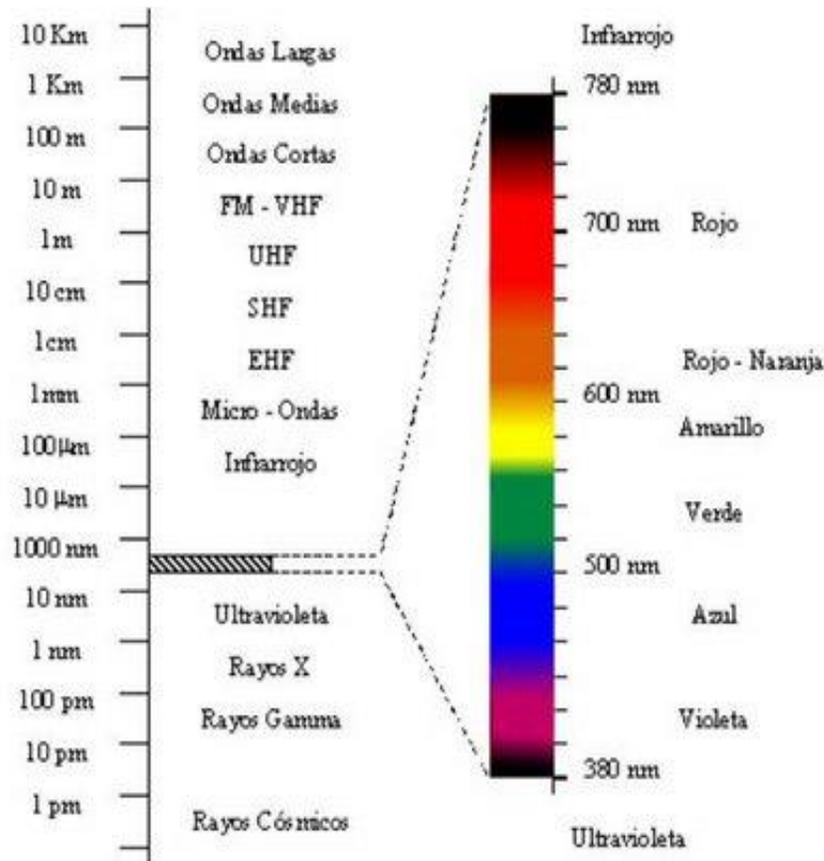


Figura 1. Representación del espectro electromagnético donde se muestran todas las formas de radiación electromagnética, desde las ondas de frecuencia extremadamente baja (FEB), a los rayos X y rayos gamma.

El espectro electromagnético es un mapa de los diferentes tipos de energía de radiación y sus correspondientes longitudes de onda, hay usualmente 6 subdivisiones (ondas de radio, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X y rayos gama).

En el medio en que vivimos, hay campos electromagnéticos por todas partes, pero invisibles para el ojo humano. Se producen campos eléctricos por la acumulación de cargas eléctricas en determinadas zonas de la atmósfera por efecto de las tormentas. El campo magnético terrestre provoca la orientación de las agujas de los compases en dirección Norte-Sur las aves y los peces lo utilizan para orientarse. Además de las fuentes naturales, en el espectro electromagnético hay también fuentes generadas por el hombre. Para diagnosticar la ruptura de un hueso por un accidente deportivo, se utilizan los rayos X. La electricidad que surge de cualquier toma de corriente lleva asociados campos electromagnéticos de frecuencia baja. Una de las principales magnitudes que caracterizan un campo electromagnético (CEM) es su frecuencia, o la correspondiente longitud de onda. El efecto sobre el organismo de los diferentes campos electromagnéticos es función de su frecuencia. Podemos imaginar las ondas electromagnéticas como series de ondas muy uniformes que se desplazan a una velocidad enorme: la velocidad de la luz. La frecuencia simplemente describe el número de oscilaciones o ciclos por segundo, mientras que la expresión «longitud de onda» se refiere a la distancia entre una onda y la siguiente. Por consiguiente, la longitud de onda y la frecuencia están inseparablemente ligadas: cuanto mayor es la frecuencia, más corta es la longitud de onda. La longitud de onda y la frecuencia determinan otra característica importante de los campos electromagnéticos. Las ondas electromagnéticas son transportadas por partículas llamadas cuantos de luz. Los cuantos de luz de ondas con frecuencias más altas (longitudes de onda más cortas) transportan más energía que los de las ondas de menor frecuencia (longitudes de onda más largas). Algunas ondas electromagnéticas transportan tanta energía por cuanto de luz que son capaces de romper los enlaces entre las moléculas. De las radiaciones que componen el espectro electromagnético, los rayos gamma que emiten los materiales radioactivos, los rayos cósmicos y los rayos X tienen esta capacidad y se conocen como «radiación ionizante». Las radiaciones compuestas por cuantos de luz sin energía suficiente para romper los enlaces moleculares se conocen como «radiación no ionizante». Las fuentes de campos electromagnéticos generadas por el hombre que constituyen una parte fundamental de las sociedades industriales (la electricidad, las microondas y los campos de radiofrecuencia) están en el extremo del espectro electromagnético correspondiente a

longitudes de onda relativamente largas y frecuencias bajas y sus cuantos no son capaces de romper enlaces químicos.

2.1.5 Campos electromagnéticos de frecuencias bajas

En presencia de una carga eléctrica positiva o negativa se producen campos eléctricos que ejercen fuerzas sobre las otras cargas presentes en el campo. La intensidad del campo eléctrico se mide en voltios por metro (V/m). Cualquier conductor eléctrico cargado genera un campo eléctrico asociado, que está presente aunque no fluya la corriente eléctrica. Cuanto mayor sea la tensión, más intenso será el campo eléctrico a una determinada distancia del conductor.

Los campos magnéticos se originan por el movimiento de cargas eléctricas. La intensidad de los campos magnéticos se mide en amperios por metro (A/m), aunque en las investigaciones sobre campos electromagnéticos los científicos utilizan más frecuentemente una magnitud relacionada, la densidad de flujo en microteslas (μT). A diferencia de los campos eléctricos, los campos magnéticos sólo aparecen cuando se pone en marcha un aparato eléctrico y fluye la corriente. Cuanto mayor sea la intensidad de la corriente, mayor será la intensidad del campo magnético.

Los campos electromagnéticos variables en el tiempo que producen los aparatos eléctricos son un ejemplo de campos de frecuencia extremadamente baja (FEB, ó ELF, en inglés), con frecuencias generalmente de hasta 300 Hz. Otras tecnologías producen campos de frecuencia intermedia (FI), con frecuencias de 300 Hz a 10 MHz, y campos de radiofrecuencia (RF), con frecuencias de 10 MHz a 300 GHz. Los efectos de los campos electromagnéticos sobre el organismo no sólo dependen de su intensidad sino también de su frecuencia y energía. Las principales fuentes de campos de FEB (frecuencia eléctrica baja), son la red de suministro eléctrico y todos los aparatos eléctricos; las pantallas de computadora, los dispositivos antirrobo y los sistemas de seguridad son las principales fuentes de campos de FI y las principales fuentes de campos de RF son la radio, la

televisión, las antenas de radares y teléfonos celulares y los hornos de microondas. Estos campos inducen corrientes en el organismo que, dependiendo de su amplitud y frecuencia, pueden producir diversos efectos como calentamiento y sacudidas eléctricas. (No obstante, para producir estos efectos, los campos exteriores al organismo deben ser muy intensos, mucho más que los presentes habitualmente en el medio).

2.1.6 Campos electromagnéticos de frecuencias altas

Los teléfonos móviles, la televisión y los transmisores de radio y radares producen campos de RF. Estos campos se utilizan para transmitir información a distancias largas y son la base de las telecomunicaciones, así como de la difusión de radio y televisión en todo el mundo. Las microondas son campos de RF de frecuencias altas, del orden de GHz. En los hornos de microondas, utilizamos estos campos para el calentamiento rápido de alimentos.

En las frecuencias de radio, los campos eléctricos y magnéticos están estrechamente relacionados y sus niveles se miden normalmente por la densidad de potencia, en vatios por metro cuadrado (W/m^2).

2.2 Efectos biológicos de los campos magnéticos

Debido a su composición electrolítica los seres vivos son por lo general buenos conductores de la electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además, en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciadas como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquellas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema como de las

características del campo externo y de las propiedades del medio en el cual tiene lugar el fenómeno(Lin J.C. 1994).

Experimentalmente se ha probado que en los cambios que sufren algunos parámetros de los sistemas biológicos por la acción de los campos magnéticos influyen no solamente la intensidad, sino también las características espaciales y temporales de dicho campo (Cadossi R., F. Bersani, A. Cossarizza, P. Zucchini, G. Emilia, G.Torelli and C. Franceschi 1992).Dentro de este contexto es diferente el efecto de un campo estático, que solamente produciría una rotación de los dipolos magnéticos moleculares, podría afectar la velocidad de las reacciones químicas dependiendo de la amplitud, frecuencia y sentido de las variaciones del campo magnético. En la literatura científica un gran número de trabajos prueban el efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vitro*, dando efectos cualitativa y cuantitativamente diferentes dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo (Harkins, T.T. and Ch. B. Grissom 1994).

2.2.1 Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento celular

El efecto que los campos electromagnéticos ejercen sobre el crecimiento celular ha sido estudiado desde el punto de vista biofísico. Los campos electromagnéticos afectan la dirección de la migración de las aves(Blakemore y Frankel,1981; Farina et al.,1982,1983 Mottas y Lins,1986; Adamhiewicz et al.,1987) y alteran el crecimiento y la reproducción de los microorganismos (Jennison,1937;Kimball,1938,Moore,1979), causan cambios en la síntesis de ADN (Liboff et al., 1985),en la orientación de las biomoléculas y biomembranas (Maret y Dransfeld,1977) y alteran el flujo de iones a través de la reproducción celular (Gerencser et al., 1962;Pothakamury et al ., 1993;Goldsworthy et al .1999).

El efecto que generan los campos magnéticos sobre el crecimiento celular se puede clasificar (Pothakamury et al.,1993) en inhibitorio, estimuladorio o no observable. Los efectos de estimulación o inhibición de los campos magnéticos se han atribuido a cambios en la orientación de las biomoléculas (proteínas), cambios en las biomembranas (lipídicas

y plasmáticas), alteraciones del flujo de iones a través de la membrana plasmática y/o cambios en la estructura de las biomoléculas (Pothakamury *et al.*, 1993).

Con base en el conocimiento del efecto que los campos magnéticos ejercen sobre los microorganismos, resulta de interés desarrollar sistemas que, haciendo uso de los campos electromagnéticos, inhiban el crecimiento de microorganismos nocivos para la salud de los humanos.

2.3 Análisis de las estructuras celulares frente a un campo eléctrico

2.3.1 La superficie celular

La superficie más externa es el límite entre la célula y su entorno, y su composición es más o menos compleja dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, algunas bacterias pueden llegar a presentar una capa de proteínas (conocida por capa S), fimbrias y pilis (ambos de naturaleza proteica), o una capa de glicocáliz (material polisacárido) que se extiende a lo largo de toda la célula.

Por tanto, siendo predominantes en la capa superficial de prácticamente todas las células los grupos de carga negativa –como carboxilos o fosfatos–, los iones positivos del medio son atraídos a la superficie creando una doble capa iónica. La formación de esta doble capa explica el alto valor de la permitividad observado en bajas frecuencias.

2.3.2 La pared celular

Esta envoltura es característica de las células vegetales y de algunos microorganismos, y es responsable de la rigidez de estas células. Presenta una diversificada y elaborada estructura que varía entre distintas células. La composición principal consiste en largas cadenas de polisacáridos, aminoácidos y otros polímeros. Los grupos cargados de la pared hacen que ésta actúe como intercambiador iónico, por lo que sus propiedades eléctricas cambiarán en función de la concentración iónica del medio circundante. Los trabajos de (Carstensen y Marquis 1968) mostraron que la conductividad

de la pared permanece relativamente constante cuando dicha concentración permanece baja, pero que aumenta rápidamente si la concentración iónica del medio excede a la propia de la pared.

2.3.3 La membrana celular

La membrana plasmática, componente principal de las células, consiste en una bicapa lipídica de entre 4 y 10 nm de espesor en la que se disponen diversas proteínas que forman canales en la transmembrana celular, regulan el transporte de nutrientes entre el exterior y el interior de la célula. En condiciones normales, la membrana presenta baja permeabilidad iónica, por lo que es considerada como una capa de baja conductividad, permitiendo a la célula mantener una diferencia de potencial con el medio externo. Esta diferencia de potencial es lo que se conoce por potencial transmembrana (TMP), cuyo valor oscila entre 10 y 100 mV, y que mantiene el interior celular negativo respecto al exterior. El TMP juega un importante papel energético y de transporte en la actividad metabólica celular, y por tanto revela el buen estado fisiológico de la célula. Mientras, el valor normal de la capacidad que presenta una membrana plasmática es de 10mF/m^2 , la presencia de ramificaciones como pliegues, microvellosidades, influye en la estimación de este valor y de su dependencia con la frecuencia del campo aplicado. De ello se deduce la importancia de incluir esta estructura de la forma más detallada posible en el modelo que apoye la caracterización dieléctrica de la célula. Dado el comportamiento y la estructura de la membrana, esta bicapa lipídica se ha comparado en múltiples ocasiones con el espacio entre las dos placas de un condensador.

2.3.4 El citoplasma

El interior celular está compuesto por una solución electrolítica en la que podemos encontrar proteínas, moléculas de agua libres o ligadas a proteínas, ácidos nucleicos, en las células eucarióticas, poseen un núcleo o vacuolas-que afectan también a las propiedades dieléctricas.

El citoplasma puede considerarse como una solución salina altamente conductora pueden ocurrir una vez que la barrera membranosa ha sido superada por el campo eléctrico, por lo que nos situamos en el rango de altas frecuencias. Especialmente significativas a frecuencias mayores de 20 MHz son las dispersiones provocadas por la rotación de las moléculas de agua, tanto las ligadas a proteínas, como las que no lo están(Aranzazú2008).

Con el objetivo de extraer información relativa a las propiedades de las células, es necesaria una teoría que relacione la célula y la polarizabilidad dieléctrica. Los primeros modelos fueron desarrollados por Pohl en 1978 (Pohl 1978).

La fisiología celular en base a sus propiedades dieléctricas es el punto en el que la Física establece un puente entre la Biología y la Microbiología. Existe evidencia en bibliografía reciente, donde se deduce la habilidad de la célula para mantener un correcto balance iónico, esencial para su estado funcional, en base a las propiedades dieléctricas de la membrana y el citoplasma.

2.4 Modelización dieléctrica de células biológicas

La interacción del campo eléctrico con las partículas biológicas estudiada a nivel celular, en base a determinados parámetros: eléctrico y fisiología celular. La distribución del campo eléctrico en el interior de la célula, su polarización, el grado de penetración de la radiación el potencial transmembrana inducido, son algunos de los parámetros con el fin de proceder a la caracterización de la biopartícula. Para todo ello, el modelo de la célula juega un papel primordial. El recurso a los métodos numéricos es indispensable cuando se pretende optimizar los modelos empleados para la simulación de partículas.(Aranzazú2008).

El método de los elementos de contorno permite modelizar las partículas con una gran aproximación a su geometría, además de adaptar el modelo a las distintas dimensiones implicadas en el problema-como las micras del diámetro celular y los nanómetros de espesor de la membrana- (Crane y Pohl ,1972).

2.5 Modelización dieléctrica de la bacteria

La bacteria es modelizada como partícula dieléctrica multicapa. El *S.aureus* bacteria gram-positiva con dos capas, posee una pared con múltiples capas de peptidoglicano en contacto con el medio externo de la célula y una membrana interna rodeando al citoplasma. Se le asignan propiedades dieléctricas (permitividad y conductividad) correspondientes. A partir de esto se realiza una aproximación teórica al comportamiento dielectroforético de la bacteria. (Johari *et al* 2003).

La evaluación teórica de los campos electromagnéticos en interacción con las partículas dieléctricas y en base a su aproximación geométrica de la célula, se realiza a través de métodos numéricos empleando ecuaciones diferenciales, método de diferencias finitas (*Finite Element Method*, FEM).

2.6 Simulación de sistemas biológicos por el método de elementos finitos

El método de los elementos finitos (MEF en castellano o FEM en inglés) es un método numérico basado en ecuaciones diferenciales para la simulación de sistemas físicos y biológicos.

Los cálculos se realizan sobre una malla de puntos (llamados nodos), el número de ecuaciones de dicho sistema es proporcional al número de nodos. El método es fácilmente adaptable a problemas para calcular campos electromagnéticos.

El análisis de elementos finitos se programa computacionalmente para calcular el campo electromagnético con el software “COMSOL MULTIPHYSIC”.

Fueron Turner, Clough, Martin y Toop quienes presentaron el MEF en la forma aceptada hoy en día utilizando los conceptos de discretizado y funciones de forma (M. J. Turner, 1956).

.2.7 Staphylococcus aureus como ejemplo de modelo teórico

En base a la caracterización dieléctrica y a su geometría celular esférica la bacteria *S. aureus* es referenciada como modelo teórico (Aranzazú 2008).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram (+), productora de coagulasa, catalasa, fermentación manitol y desoxirribonucleasa.

Este microorganismo fue descrito por vez primera en el año 1880, concretamente en la ciudad escocesa de “Aberdeen”, por el cirujano Alexander Ogston en el que drenaba un absceso piógeno en humano.

El nombre de *Staphylococcus* se deriva del griego staphylé que significa “racimo de uvas”. El *S. aureus* es miembro de la familia Micrococcaceae, el cual se observa al microscopio como cocos grampositivos, que se agrupan en parejas, tétradas o racimos, no motiles, no formadores de esporas, habitualmente anaerobias facultativas. Conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado (Hidalgo-García, et al., 2011). Se distingue de otras especies de estafilococos por presentar una coloración dorada en sus colonias. Posee un cromosoma circular con plásmidos en el interior, moléculas de DNA extracromosomales capaces de llevar a cabo replications independientes. Produce una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de mucosas las cuales son relativamente benignas, tales como la forunculosis o conjuntivitis, foliculitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además afectar al aparato gastrointestinal ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

Habita tanto en las mucosas como la piel del ser humano, lo que permite que a través de heridas quirúrgicas pueda penetrar al torrente sanguíneo.

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos eficaces para combatirlos los amino glucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina.

El *S. aureus* es el responsable del 70 al 80 % de las infecciones supurativas en la piel. Es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéteres de nutrición parenteral total y periférica, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria continuada, derivaciones ventrículo-peritoneales, endoprótesis, prótesis valvulares cardíacas y prótesis articulares, marcapasos etc. (Okajima, et al., 2006; Palavecino,2002). Las cepas que provocan infecciones asociadas a cuerpos extraños,suelen proceder de lamicrobiota endógena del paciente.

Sin embargo, también producen infecciones nosocomiales exógenas (Schneider y Zeitz,2004).En cuanto a la patogenicidad se sabe que las cepas de *S. aureus* poseen la capacidad de adherirse a polímeros y de generar biopelícula que surgen de la multiplicación y formación de una cepa mucosa (glucocálix) del patógeno. Este proceso se ve reforzado en presencia de proteínas como fibrinógeno. Las biopelículas son focos infecciosos a partir de los cuales las bacterias entran en el torrente circulatorio y pueden causar sepsis (enfermedad grave en la cual el torrente sanguíneo se encuentra inundado de bacterias) (Juárez, et al.,2006). Esta característica llega a ser importante en pacientes inmunocomprometidos, porque *S. aureus* es hasta el momento el agente causal de infecciones y el productor más conocido de la formación de biopelícula (Gaudioso, et al., 2006).

2.8 Biopelículas bacterianas

2.8.1 Definición de biopelículas

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos irreversiblemente adheridas a una superficie que producen sustancia polimérica extracelular (SPE) y que exhiben un estado metabólico alterado comparadas al crecimiento planctónico correspondiente, especialmente con respecto a la trascrición y las interacciones entre las células (Lindsay y Holy, 2006).

2.8.2 Características y propiedades de biopelículas

Hay una creciente apreciación de que la formación de biopelícula contribuye a la patogenicidad de determinados microorganismos y que la persistencia de las biopelículas en

el cuerpo humano sería la principal causa de la recurrencia o cronificación de diversas infecciones (Reisner et al., 2006).

Se considera que las biopelículas están implicadas en más del 80% de las infecciones crónicas causadas por bacterias, incluyendo otitis media, endocarditis, gastritis, infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Sauer et al., 2007).

Las biopelículas son por defecto el modo de crecimiento de la mayoría de los patógenos. Este modo de crecimiento maximiza la obtención de nutrientes favoreciendo la colonización, permite la cooperación entre las cepas por medio del crecimiento en comunidad y propicia la protección frente a los mecanismos de defensa de hospedador o a sustancias antimicrobianas (Jefferson, 2004).

El crecimiento bacteriano en superficies depende de la interacción entre varios factores de la superficie bacteriana y del sustrato, además del medio ambiente que los rodea. Generalmente las superficies son acondicionadas con una fina película de moléculas orgánicas las cuales pueden ser atractivas a los sistemas quimiotáctiles bacterianos y permitir el desarrollo de la biopelícula (Reisner et al., 2005; Vila et al., 2008).

Tras el acondicionamiento de la superficie ocurre la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas. Ese fenómeno ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Lindsay y Holy, 2006; Tenke et al., 2006).

Conviene resaltar que la interacción inicial entre las bacterias y superficies inertes, como material protésico, puede ocurrir tanto sobre material virgen como sobre material recubierto con macromoléculas derivadas del hospedador (Vila et al., 2008). Sin embargo, macromoléculas de los fluidos corporales se adsorben extremadamente rápido sobre los materiales implantados en el cuerpo formando la película condicionante (Gorman y Jones, 2003; Tenke et al., 2006).

La etapa siguiente consiste en la adhesión irreversible de las bacterias por producción de SPE y debido a la estimulación de proteínas receptoras de la pared bacteriana se lleva a cabo el desarrollo de puentes célula-a-célula que las unen unas a las otras, lo que estabiliza la estructura formada en un proceso denominado maduración. El siguiente período es conocido como colonización de la superficie, en él las bacterias adheridas crecen formando microcolonias que son consideradas las unidades fundamentales de una biopelícula (Lindsay y Holy, 2006).

La maduración de la biopelícula corresponde al crecimiento tridimensional y definición de una arquitectura por las interacciones entre las bacterias adheridas. Ese proceso conlleva la creación de ambientes heterogéneos desde el punto de vista fisicoquímico en el cual las bacterias asociadas a la biopelícula presentan características fisiológicas distintas de las planctónicas (Beloin et al., 2008).

Además, dependiendo de la cepa implicada, las microcolonias pueden estar compuestas de 10 – 25% de células y de 75 – 90% de matriz SPE. Las biopelículas contienen “canales de agua” que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y señales químicas que las células secretan en respuesta al aumento de la densidad poblacional y que interfieren en el desarrollo de la biopelícula (Tenke et al., 2006).

En la actualidad es bien conocido el sistema de comunicación entre las bacterias por medio de secreción de pequeñas moléculas difusibles. Varios estudios recientes indican que la formación de biopelícula es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlados por señalización célula-a-célula en un mecanismo denominado “quorum sensing”(Jiang y Pace, 2006).

En un creciente número de cepas bacterianas se evidencia ese tipo de comunicación en el cual las bacterias pueden sentir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad. El “quorum sensing” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula (Jiang y Pace, 2006; Sauer et al., 2007).

Una vez que la biopelícula ha madurado, tiene lugar la dispersión de células a otras regiones. Inicialmente se pensó que ese proceso era pasivo y dependiente de las fuerzas de arrastre del medio, pero estudios recientes sugieren que la dispersión es un proceso activo y estrictamente regulado por las células adheridas (Lindsay y Holy, 2006).

Asimismo, condiciones ambientales interfieren en la dispersión de la biopelícula entre esas se incluyen la disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH y presencia de determinados compuestos químicos (Goller y Romeo, 2008).

En la figura 2 están representados los principales eventos en el desarrollo de las biopelículas.

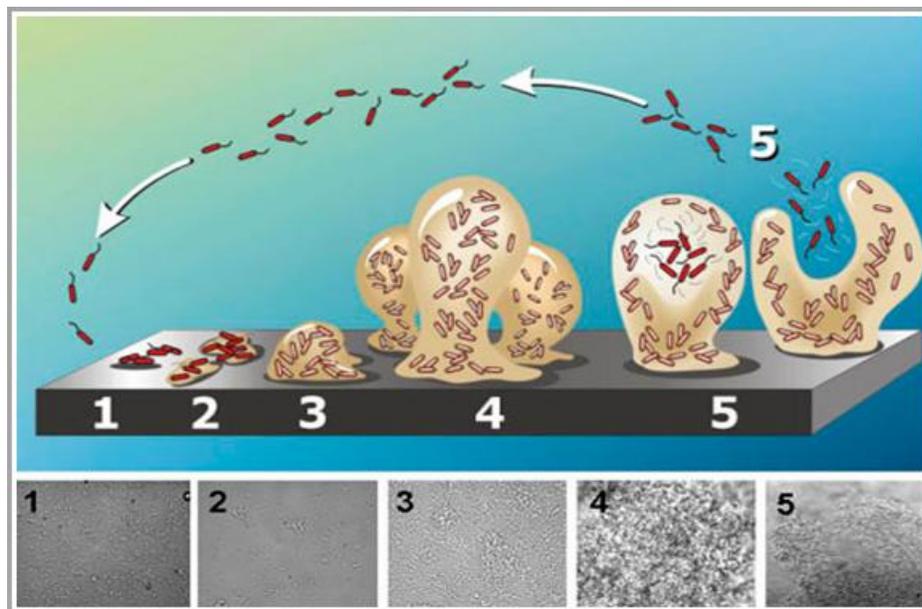


Figura 2 Eventos en el desarrollo de biopelícula (Balaban et al.2007)

(1) Adhesión reversible (2) Adhesión irreversible y producción de SPE (3) Formación de microcolonias (4) Desarrollo de estructuras tridimensionales y maduración de la biopelícula (5) Dispersión de células.

Durante su evolución, las bacterias han modificado constantemente su metabolismo y características físicas, adaptándose prácticamente a todos los ambientes del planeta (Haley, et al., 1980; Surveill, et al., 1984).

La matriz constituye un complejo ambiente esencialmente compuesto en un 97% de agua, pero que tiene polímeros extracelulares, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos / fosfolípidos, nutrientes absorbidos y metabolitos.

La biopelícula representa sociedades microbianas con sus propias defensas y sistemas de comunicación (Crede, et al., 1988; Von, et al., 2002).

Las bacterias son capaces de sobrevivir en candentes géiseres de origen volcánico o en suspensiones hiperosmolares extremas de algunos lagos, o a grandes profundidades marinas, donde se adaptan perfectamente. Además se encuentran prácticamente en cualquier parte: suelos, agua, y en los seres vivos, en simbiosis permanente (Haley, et al., 1980; Spengler y Greenug, 1978; Zhiquiang, et al., 2007).

Existen varios factores involucrados en esta adherencia inicial, como la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares; la segunda, de multiplicación celular y producción del polisacárido de adherencia intercelular, que implica la adhesión entre bacterias, da como resultado la formación de una microcolonia y la compleja arquitectura de la biopelícula (Gaynes y Horan, 1996; Haley, et al., 1985; Rodríguez-Martínez, et al., 2007; Surveill, 1988).

La matriz glucoprotéica no sólo permite el intercambio de metabolitos entre microcolonias y el exterior, sino que además les confiere una barrera protectora contra ambientes adversos, como falta de nutrimentos, medio hiperosmolar, anaerobiosis, presencia de anticuerpos, macrófagos y antibióticos. Sin embargo, las bacterias sacrifican su capacidad de crecimiento y desplazamiento dentro de la biopelícula (Crede y Hierholzer, 1988). Varias son las bacterias que se han determinado como formadoras de biopelícula, tanto Gram positivas y negativas, así como también patógenas y no patógenas, algunos ejemplos son *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona fluorescens*,

*Escherichiacoli, Vibrio cholerae, Enterococcus*ssp, *Streptococcusmutans*(William y Petri, 2002).

Actualmente existe un gran interés para la medicina en la observación que las bacterias patógenas se adhieren a dispositivos plásticos (prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, lentes de contacto, injertos plásticos y dispositivos intravenosos temporales o permanentes. Una vez adheridas comienzan a formar la biopelícula, que impide la acción no sólo de fagocitos y anticuerpos que tratan de eliminarlos, sino además de antibióticos indicados como tratamiento. Se ha encontrado que al obtener cultivos de estas bacterias, son sensibles in vitro a los tratamientos convencionales; sin embargo, las grandes moléculas de antibióticos no logran atravesar la estrecha red de glicoproteínas de la biopelícula para llegar a su sitio de acción (Diaz, et al., 1999; Edmond y Wenzel, 1995). Se reduce la eficacia de los antibióticos cuando la *S.aureus* existe dentro de una biopelícula adherida en las superficies de aparatos médicos colocados en un órgano (Polonio, et al., 2001).

Un ejemplo cotidiano de biopelícula lo constituye la placa dental, es de suma importancia combatir la biopelícula que recubre la superficie de los dientes para evitar el desarrollo excesivo de microorganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. La capacidad de formación de biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelícula.

Todos los días nos lavamos los dientes. Una operación rutinaria para hacer frente a la biopelícula (o *biofilmen* inglés) microbiana que nos es más familiar: la placa dental. Se forman biopelícula cuando los microorganismos crecen agregados en algún tipo de interfase, sólido-líquido, sólido-aire, líquido-aire o entre líquidos inmiscibles, unidos por material extracelular propio, siempre que haya materia orgánica y humedad suficientes.

La caries dental es una de las enfermedades de etiología bacteriana común entre los seres humanos, y considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, debido a que afecta la calidad de vida y personalidad de los individuos además,

requiere de una inversión personal y gubernamental importante. Esta enfermedad es producto de una serie de cambios producidos por bacterias específicas, entre ellas *Streptococcus mutans*, presentes en la biopelícula de placa bacteriana supra gingival. Estas bacterias mediante sus factores de virulencia son capaces de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad, debido al desequilibrio iónico en el proceso de remineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente resultado del metabolismo de carbohidratos por parte de estas bacterias. *Streptococcus mutans*, especie bacteriana perteneciente al grupo mutans streptococci y distribuida ampliamente en la población mundial, ha ido implicado como el principal agente etiológico de caries dental.

La caries dental junto con la enfermedad periodontal, son las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana común en los seres humanos (Sturdevant, C, Roberson, T and H. Heymann. 1996). La caries dental es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, calculándose que aproximadamente un 90 % de la población mundial es afectada por esta enfermedad en algún momento de la vida (Bowen W.H. 1999).

Además, la caries dental conlleva altos costos, que aunque intangibles, afectan la calidad de vida de las personas. Entre estos hay que considerar el dolor, el cual varía, desde la sensación aguda sentida al comer hasta el dolor pulsante asociado a la hipersensibilidad térmica y a la inflamación de la pulpa dentaria (Urzúa, I y Stanke, F. 1999).

La caries dental se debe reconocer como un proceso patológico importante en la historia del hombre, un problema universal y costoso que ha de ser afrontado por la odontología.

Su carácter peculiar deriva de ser producida por una microbiota compleja de placa dental supragingival, de su condición progresiva, costo, sufrimiento y efectos sobre la salud y personalidad del individuo afectado. En 1986 Walter Loesche describe la caries y la

enfermedad periodontal como “quizá las infecciones más caras que tienen que afrontar las personas a lo largo de su vida”.

Numerosos estudios se han destinado a investigar sobre la prevención de enfermedades bucales, en especial caries dental, poniendo especial énfasis en las medidas que controlen la formación de placa bacteriana dental y así reducir la presencia del agente patógeno.

La placa dental es una película acelular constituida por glucoproteínas de origen salival y bacterias, adheridas a la superficie de los dientes, responsable del desarrollo de ciertas enfermedades orales específicas como son la caries y la enfermedad periodontal. Es una masa blanda tenaz y adherente de colonias bacterianas rodeadas por materiales extracelulares de origen bacteriano y salival, que se coleccionan sobre la superficie de los dientes, la encía y otras superficies bucales cuando no se practican métodos de higiene adecuados.

Durante años se ha puesto especial interés en determinar la función de la placa dental bacteriana en el inicio de la lesión cariosa en lugares específicos del diente. La placa dental ha sido definida como: *una masa blanda, translúcida y muy adherente que se acumula sobre la superficie de los dientes, formada casi exclusivamente por bacterias y sus subproductos*. La OMS, 1960 la define como “*Una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímicamente metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries*” (Huerta J. 1975). Su acumulación constituye una sucesión de acontecimientos muy ordenados y perfectamente bien organizados (Sturdevant C, Roberson .T and H. Heymann 1996). La formación de placa dental sobre la pieza dentaria expuesta al medio bucal, comienza a los pocos minutos aun después del cepillado aun cuando se deposita sobre ella una capa acelular mucinosa, libre de bacterias llamada “cutícula dentaria” o película dental adquirida (PDA). Posteriormente, diversas formas bacterianas se agregan a ella adhiriéndose mediante uniones iónicas, electrolíticas o de tipo ligando-lectina y la colonizan, comenzando a elaborar el dextrán, un polisacárido extracelular de alto peso molecular,

viscoso y adherente, el cual se produce exclusivamente a partir de la sacarosa (Urzúa. I y Stanke. F. 1999). Sólo algunas especies bacterianas, en especial *Streptococcus mutans*, son capaces de adherirse a las superficies bucales como la mucosa y superficie dentaria (Huerta J. 1975). Estas bacterias adherentes disponen de receptores especiales y producen además, una matriz pegajosa, el dextrán, que les permite cohesionarse fuertemente entre sí. Una vez que se fijan los microorganismos pioneros proliferan y se extienden lateralmente formando una cubierta similar a una estera sobre dicha superficie. El crecimiento bacteriano posterior es en volumen, vertical sobre la superficie del diente (hacia el exterior). La cubierta mixta streptococcica resultante permite que se adhieran otros microorganismos como bacterias filamentosas y espirales, que de otro modo no podrían fijarse a la superficie dentaria. Por consiguiente, la formación de una placa madura conlleva una serie de cambios y cada uno dependerá de la fase previa durante la que se preparan las condiciones locales para la siguiente fase (Loesche .W.J. 1986). Entre los 4 y 10 días ya se puede observar una placa bacteriana dental madura.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cada vez más, los pacientes que acuden al consultorio dental solicitan información sobre alternativas para tratar la caries dental la cual es un problema grande de salud para el hombre moderno. Es conocida como una enfermedad infecto contagiosa.

Una mala salud bucodental puede tener profundas repercusiones en la salud general y en la calidad de vida, el dolor, los abscesos dentales, los problemas al comer o en la masticación, la pérdida de piezas dentales tienen efectos importantes en la vida y el bienestar cotidianos de las personas.

Se han establecido diversos tratamientos para eliminar la caries sin poder erradicarla. Por lo antes mencionado es importante generar nuevas alternativas de tratamiento. Y la pregunta es: ¿Será posible que los campos electromagnéticos puedan eliminar bacterias productoras de caries como una medida alternativa para el tratamiento y su control?

IV JUSTIFICACIÓN

El hecho de encontrar a la caries como un problema de salud pública en nuestra población nos obliga a pensar en nuevas metodologías de tratamiento y control del padecimiento. La aplicación de CEM se convierte en una nueva vía alternativa de aplicación, pues en diversos estudios se muestran que es posible que se eliminen bacterias, siendo así, no sólo reduciría la prevalencia de caries humana sino también los costos en el tratamiento de los pacientes que en algunos casos se eleva a más de 10 000 pesos al año, ésta cifra puede elevarse varias veces si el paciente no se atiende adecuadamente. Además de la economía el problema de la incapacidad para desempeñar sus funciones normales lo cual conduce también a bajo rendimiento y pérdida económica para los organismos o instituciones donde se encuentre. La atención médica en las instituciones de salud se ve afectada por la gran demanda de pacientes con caries. Y por otro lado los tratamientos en ocasiones son dolorosos.

La aplicación de CEM no implica contacto estrecho con el paciente ni prolongado, y posiblemente es muy bajo el costo, lo cual traería resultados adecuados para nuestras poblaciones.

V HIPÓTESIS

Los campos electromagnéticos serán capaces de eliminar el crecimiento y formación de biopelícula de bacterias productoras de caries.

VI OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Determinar el efecto de los campos electromagnéticos a diferente frecuencia e intensidad de CEM en el crecimiento y producción de biopelícula de bacterias productoras de caries empleando a *S. aureus* como referencia.

6.2 Objetivos Específicos:

- Diseñar una bobina para aplicación de campos electromagnéticos.
- Estandarizar la técnica de CEM sobre la biopelícula de *S. aureus*.
- Estandarizar una técnica para determinar la presencia de biopelícula en bacterias empleando como referencia al *S. aureus*.
- Determinar el efecto de CEM sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar el efecto de los CEM sobre la biopelícula y crecimiento de *S. aureus* así como el desarrollo de bacterias aisladas de pacientes.
- Describir el efecto de los CEM sobre *Staphylococcus aureus* y las bacterias aisladas de pacientes con caries mediante microscopía electrónica de barrido sobre la composición elemental.
- Proponer un modelo teórico para demostrar el efecto de los CEM.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

El presente diseño es de tipo experimental encaminado a encontrar el efecto de los campos electromagnéticos sobre los microorganismos productores de caries.

7.1 Diseño de bobina de Helmholtz y equipo para aplicación de campos electromagnéticos

7.1.1 Sistema de aplicación de CEM

El sistema para generar CEM se diseñó con dos componentes principales, el generador de señal y el sistema de bobinas de Helmholtz. La medición del campo se realizó con un gaussímetro de efecto Hall. El generador entregó una onda cuadrada de amplitud pico-pico variable de 0-22 V, con frecuencia de 10 Hz hasta 10kHz. La señal que fue monitoreada en un osciloscopio. La señal pasa a una bobina en el interior de la cual se colocaron cajas de Petri que contenían las bacterias las cuales fueron expuestas a CEM a diferente frecuencia, tiempo de exposición e densidad de flujo magnético.

7.1.2 Especificación y dimensión del equipo

La bobina se elaboró en configuración Helmholtz en honor al físico alemán Herman von Helmholtz consistió en un par de bobinas circulares conectadas en serie de tal manera que la corriente circulaba en la misma dirección en cada una de ellas. Esto indujo un campo magnético uniforme en el centro, el cual es proporcional al número de vueltas y a la corriente que circula en el alambre. Se elaboraron con tubo de cartón como soporte, con un

diámetro interior de 30 cm y una altura de 22 cm una separación de las bobinas de 15 cm y núcleo de aire en el interior del cual se colocaron los recipientes de cajapetri con los cultivos microbianos durante el tratamiento de CEM. Se utilizó alambre magneto con calibre 18, y 200 vueltas de alambre en cada bobina. Las dimensiones de las bobinas se definieron con base en las dimensiones de los recipientes usados para contener el cultivo durante la aplicación de campo electromagnéticos buscado que el cultivo se ubicaba en la región donde el campo es más uniforme es decir el centro geométrico del cilindro conformado por la bobina “Ley de Biot-Savart” (Tipler,2005).

7.1.3 Fuente de voltaje

Para alimentar las bobinas que producen los campos magnéticos, se usó una fuente de poder (PASCO “Scientific” SF-9584 A). Esta fuente produce un voltaje regular de 0 a 22 V, en corriente directa.

7.1.4 Generador de funciones

Se usó un generador de funciones *Elenco* GF8056 de 1GHz para generar una señal senoidal que alimenta al circuito amplificador para fijar la amplitud y frecuencia que para los experimentos varió de 10 Hz hasta 10 kHz.

7.1.5 Osciloscopio

Se usó un osciloscopio Tektronix TDS 220 para monitorear las señales producidas por el generador de funciones y para monitorear la salida del circuito amplificador.

7.1.6 Circuito amplificador

Se usó un circuito amplificador que se alimenta por la señal de voltaje emitida desde el generador de funciones y para monitorear la salida del circuito amplificador. El rango de amplitud de voltaje que se visualizó fue de 0 a 22 V.

Tabla 1 Equipo electrónico utilizado en el desarrollo experimental de ésta tesis y funciones de cada uno para generar campos electromagnéticos.

Instrumento	Función
Generador de funciones <i>Elenco GF8056</i>	Control de frecuencia y amplitud del campo oscilatorio
Osciloscopio <i>Tektronix TDS 220</i>	Verificación de la frecuencia y amplitud del campo oscilatorio
Fuentes de voltaje <i>PASCO Scientific SF-9584 A</i>	Alimentación de campo oscilatorio
Circuito amplificador	Alimentación del campo oscilatorio
Bobina Helmholtz	Generación del campo oscilatorio
Sensor de campo magnético PASCO	Medición de campos magnéticos

A la bobina se adaptó y conectó una fuente de poder (PASCOscientific SF-9584) y un generador de funciones (Elenco GF8056), así como un circuito eléctrico que sirve como amplificador y controlador de la corriente que circula por la bobina. Figura 3 sistema para aplicación de CEM).

Una vez terminada de construir la bobina se calibró con un gausímetro marca (XplorerGLX(PS-2002) ver Figura 4Se hizo circular una corriente de 3 A, produciéndose las siguientes intensidades de campo magnético al centro de la bobina: de 1,3,5 y 18 mT.

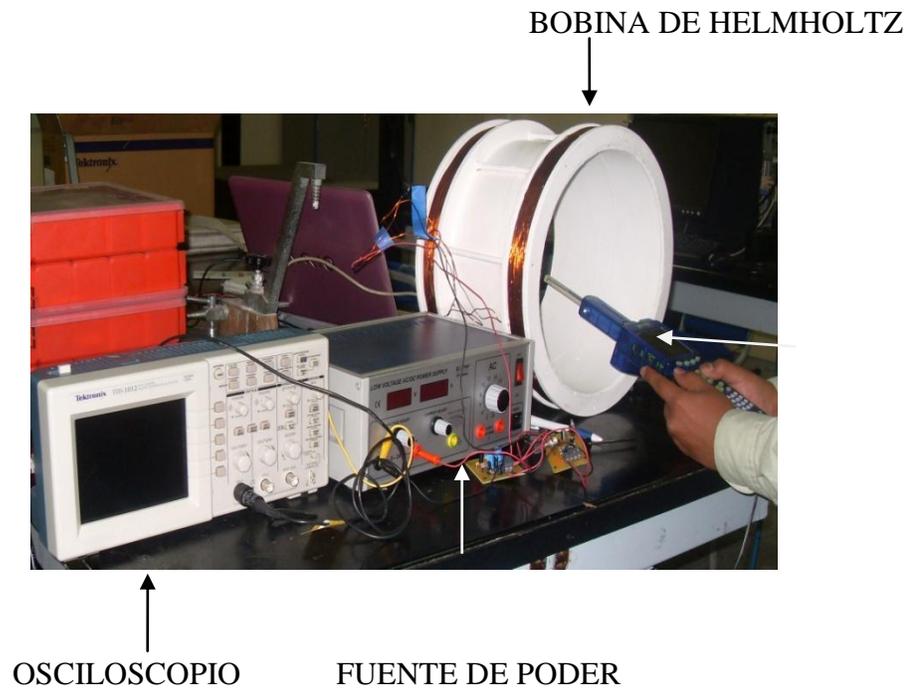


Figura 3 Representa el sistema para aplicación de campos electromagnéticos el cual consta de una Bobinas de Helmholtz, osciloscopio, fuente de poder y gausímetro para medición de intensidad magnética).

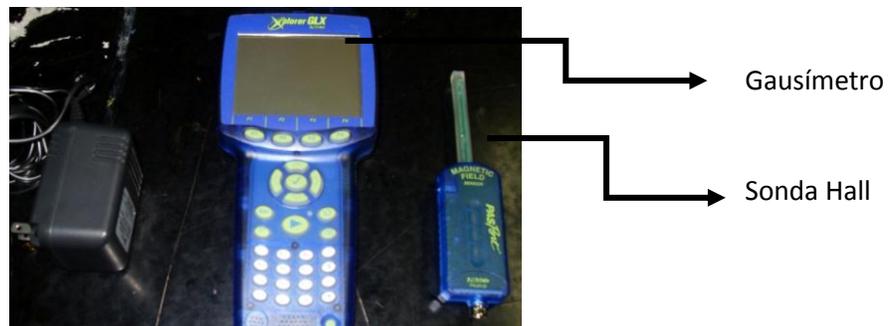


Figura 4 Sensor de campo magnético (Xplorer GLX(PS-2002))

El gausímetro es un aparato electrónico con una sonda Hall para medir campos magnéticos ,(sensor de punta llamada sonda Hall que suministra una señal proporcional a la inducción magnética).

7.2 Estandarización de las condiciones de CEM aplicadas a microorganismos productores de biopelícula

7.2.1 Efecto de CEM sobre biopelícula

Con el propósito de saber si los campos electromagnéticos influyen sobre la formación de biopelícula. Se probaron diferentes condiciones de CEM sobre dos bacterias, una productora de biopelícula (*S.aureus* 1654) y la otra no productora de biopelícula (cepa bacteriana 54). Las condiciones fueron las siguientes:

Voltaje: 22 V

Amperaje: de 3 A

Frecuencia: 50 Hz y 10kHz

Intensidad de campo: 5 y 18 mT

Tiempo de exposición: de 1 min a 36 h de exposición a CEM

Condiciones finales de trabajo: 50Hz, 3 A ,5mT y 10 kHz ,3 A y 18 mT

Las bacterias se sembraron en Agar BHI –rojo congo 5% incubándolas 24 h a 37°C el criterio de inhibición de biopelícula se indicó midiendo la distancia del halo que se forma alrededor de la colonia y por la coloración de la misma.

7.3 Estandarización de técnicas para la formación de biopelícula.

a) *Método de Microplaca*

b) *Método de Rojo Congo con sacarosa al 5 y 10 %*

7.3.1 Método de Microplaca

El ensayo de la formación de biopelícula se realizó con modificaciones según (Christensen, et al.,1985).Las cepas de *S.aureus* se cultivaron en 5 ml de medio líquido BHI por 24 h a 37 °C, cuando se requirió, se agregó NaCl a una concentración final de 5% para inducir la formación de biopelícula. Posteriormente, se realizó una dilución de 1:200 con medio agar soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés) fresco y se colocaron 200µL en un pozo de una microplaca de 96 pozos (el ensayo se realizó por cuadruplicado para cada cepa), la placa se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con regulador fosfato salina(PBS) 1X al final de los lavados se agregó 200µL de safranina al 0.1% y se dejó reposar por 5 min.Se retiró la safranina por decantación y se lavó dos veces con PBS1X,posteriormente se midió absorbancia a 490nm en un lector de ELISA, empleado como blanco medio de cultivo sin crecimiento, valores ≥ 0.12 DO fueron considerados positivos para la formación de biopelícula.

7.3.2 Método de Rojo Congo en caja de petri con medio de cultivo Trypticaseína (TSA) e Infusión cerebro corazón(BHI)

La técnica del rojo congo consistió en la preparación de placas de base de TSA, adicionando rojo congo a una concentración final de 0.8mg/ml (Freeman, et al., 1989).

La técnica de BHI con rojo congo y sacarosa al 5 % consistió en preparar el agar BHI polvo agregando 10.4 gr en 100 ml de agua destilada y adicionando rojo congo a una concentración final de 0.8mg/ml, posteriormente se preparó 100 ml de agua destilada agregando 10 g de sacarosa y, se disolvió con un agitador magnético.

Las cepas de *S.aureus* previamente fueron cultivadas en 5 ml de medio líquido, BHI por espacio de 24 horas a 37°C. Apartir de este cultivo se sembraron por estría abierta en las placas de rojo congo y se incubaron por 24 horas a 37°C. Las cajas con crecimiento bacteriano se colocaron en refrigeración a 4°C por 24 horas al término de este periodo, se identificó la producción de biopelícula (positiva) por la presencia de color negro y la ausencia de biopelícula (negativa) por la presencia de colonias rojas.

Las cepas de *S. aureus* fueron cultivadas en 5 ml de medio líquido, caldo nutritivo por espacio de 24 horas a 37°C. Apartir de este cultivo se sembraron por estría abierta en las placas de rojo congo y se incubaron por 24 horas a 37°C se identificó la producción de biopelícula (positiva) por la presencia de color negro.

La técnica de rojo congo al (2X) doble de concentración, consistió en la preparación de placas de base de BHI mezclando 50 ml de BHI al 2x con 50 ml. de solución con sacarosa al 10% y rojo congo.

La finalidad de usar estas técnicas es la formación de biopelícula. Se optó por la técnica de BHI al 5 % debido a que se observaba mejor el color en la biopelícula siendo esta de color negro.

7.3.3 Selección de cepas productoras de biopelícula

Con la finalidad de tener controles positivos y negativos a biopelícula se seleccionaron cepas que tuvieran una franca presencia o ausencia de biopelícula, en total fueron 19 cepas ensayadas (Tabla 2).

Tabla 2 Se indican cepas bacterianas así como su origen utilizadas como controles positivos y negativos a biopelícula

Cepa bacteriana	Origen de la cepa
54	Pulque
94	Pulque
3	Pulque
71	Pulque
69	Pulque
60	Pulque
45	Pulque
66	Pulque
52	Pulque
11	Pulque
14	Pulque
102	Pulque
75	Pulque
44	Pulque
47	Pulque
1668 (S. aureus)	Paciente 1 con oftalmia
1654 (S. aureus)	Paciente 2 con oftalmia

1986 (<i>S. aureus</i>)	Paciente 3 con oftalmia
ATCC (<i>S. aureus</i>)	Paciente 4 con oftalmia

7.4 Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (cepa 1654)

Para determinar la curva de crecimiento se preparó un cultivo de 50 ml de caldo nutritivo al cual se sembró con *S. aureus* desarrollado en placa; y se incubó a 37°C y a diferentes tiempo, se tomó 5 ml de la suspensión para medir por espectrofotométricamente la turbidez la cual se iba registrando hasta alcanzar la fase estacionaria, se midió hasta 36 horas. Para cuantificar las bacterias se empleó una curva estándar de sulfato de bario a diferentes concentraciones y para determinar las UFC, de cada muestra que se tomaba para medir espectrofotométricamente también se obtenía una alícuota de 10 ml la cual se diluía hasta obtener diluciones de 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y se procedió de estas muestras sembrar en placas: una de agar tripticaseína y la otra de agar BHI rojo congo. Se incubaron a 37°C por 24 h después se contó el número de colonias y al multiplicar por el factor de dilución se registraba el número de UFC.

Antes de iniciar la curva de crecimiento se realizó una tinción de Gram con la finalidad de asegurar de que sean cocos en racimo Gram + y se usó la prueba de catalasa para demostrar la presencia de *S. aureus*, la cual fué positiva.

7.5 Efecto de CEM sobre crecimiento de microorganismos

Se probaron las mismas condiciones a las mismas bacterias para determinar si hubo o no crecimiento de colonias de ambas bacterias. Para ello se sembraron ambas colonias en Agar BHI –rojo congo 5% incubándolas 24 h a 37°C. El criterio para saber si hubo efecto fue sobre ausencia o presencia así como la cantidad de colonias presentes en las placas.

7.6 Efecto de los CEM sobre el crecimiento de *S. aureus* (cepa 1654)

S. aureus es una bacteria productora de biopelículas sobre la cual se ha observado efectos electromagnéticos sobre su desarrollo (Andreas Obermier, Florian Dominik Matlet et al., 2009); se utilizó como referencia para establecer las condiciones para estudiar el efecto de los CEM sobre bacterias productoras de caries. En este caso se trabajó con un cultivo de la cepa 1654 de *S. aureus* de la siguiente manera:

Se prepararon 2 cultivos en caldo nutritivo para favorecer su desarrollo sembrados con la cepa 1654, uno de ellos se empleó como control y el otro como cultivo de prueba.

El primero se incubó a 37°C durante 24 h; el segundo se incubó durante 24 h. sometándose a CEM bajo las siguientes condiciones: 50 Hz, 5 mT, 3 Amperes y 22 Voltios y con tiempo de exposición a CEM desde 0 a 36 h.

Se realizó una tinción de Gram para saber si era la cepa indicada (cocos en racimo gram+, y se realizó la prueba de catalasa, lo que indicaría que se trata de *Staphylococcus*, y por tanto es el control de que es la 1654.

Se inoculó 10 µl de cultivo desarrollado un día antes, en un matraz con 50 ml de caldo nutritivo.

Semidió su crecimiento mediante medición de las absorbancias a partir de 0, 3, 6, 9, 12, 24, y 36 h.

Para la lectura de la muestra se tomaron 10 ml de cultivo y se mezclaron con 9.9 ml de SSI (NaCl 0.85%) estéril; en seguida se realizó otra dilución de la misma manera (1/100) y después otra más de tal forma que se tuvieron tres diluciones: 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , y de cada una se tomaron 100 µl para sembrar en respectivas placas de agar BHI-rojo congo con sacarosa al 5% y agar tripticaseína. Las placas se incubaron 24 h a 37°C después de la incubación se contaron las UFC en cada placa y se registró la presencia o ausencia de biopelícula.

Para medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro marca: thermoScientific Modelo: Genesys 20.

7.7 Determinación del efecto de los CEM sobre la superficie de las bacterias observadas mediante microscopía electrónica de barrido

Para saber si los CEM actuaban sobre la superficie de las bacterias desarrolladas en cultivo fueron muestreadas en el punto de mayor inhibición de su curva de crecimiento las cuales se prepararon para su observación al MEB de la siguiente manera: de cada cultivo desarrollado se tomó con un asa bacteriológica una muestra y se pasó sobre un cilindro metálico para su fijación, la cual se dejaba durante 24h a temperatura ambiente; una vez fijada se montaba sobre un pedestal metálico provisto de cinta conductora adhesiva con doble capa, que sujetaba firmemente a ésta. (Figura 5). El siguiente paso fue recubrir la muestra con un metal conductor como el oro, (técnica simplificada para observar la morfología de las bacterias) y se aplicaba al vacío para ionizarla (Figura 6). Una vez ionizada la muestra se observa al microscopio electrónico de barrido para describir si se afectaba la superficie de las bacterias y realizar su análisis de elementos químicos (Figura 7).

El equipo usado para el análisis de MEB fue un microscopio JEOL 6300, modelo JSM, con un alcance de 300 000 ampliificaciones, spot size de 10^{-2} a 10^{-5} amp y una resolución de 20 KeV. Este equipo cuenta con un espectrómetro de Rayos-X por dispersión de energías, con el cual se determinan las intensidades relativas de los elementos presentes en el material dentro de un área de análisis de 1m^2 . Este microanálisis es semicuantitativo y permite conocer elementos presentes en la muestra y su concentración aproximada.

La finalidad de este análisis fue medir a diferentes ampliificaciones para observar la morfología de los microorganismos y su composición química superficial, para lo cual se montaron las muestras en unos stubs, sobre una cinta de grafito y se recubrieron con oro en

una evaporadora marca DENTUM VACUUM, en un tiempo de recubrimiento de 2 min a una presión de 20 millitor. En tanto que para efectuar los microanálisis, las muestras se montaron en unos stubs las cuales fueron recubiertas con una fina capa de oro (0,1 μm de grosor).

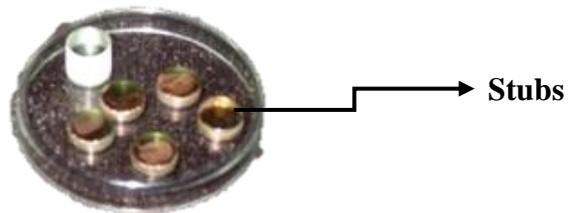


Figura 5 Se ilustra el montaje de las muestras sobre unos portamuestras especiales (stubs) recubiertas con fina capa de oro para observar morfología de bacterias y análisis de las mismas en el MEB



Figura 6 Ionizador de muestras para observar al MEB



Figura 7 Microscopio Electrónico de Barrido.Instructions Jeol-1991.JSM - 6300.Scanning microscope.TokioJapan (Equipo para análisis morfológico de bacterias).

7.8Efecto de CEM sobre bacterias aisladas de pacientes

Una vez establecidas las condiciones de inhibición bacteriana se trabajó con muestras de microorganismos aisladas de pacientes con caries. A cada paciente se le dio una carta de consentimiento informado se le pidió su autorización para tomar una muestra de placa dentobacteriana y así realizar el aislamiento de las bacterias presentes en caries. Las muestras se aislaron de la siguiente manera: para poder determinar la presencia, localización y cantidad de placa bacteriana fue necesario utilizar un método para hacerla visible. Se le da al paciente una tableta reveladora a base de fuccina básica al 0.03 por ciento, con la finalidad de detectar la presencia de placa bacteriana una vez coloreada la zona se procedió con un hisopo estéril a tomar la muestra y colocarla en una caja de petri con TSA y sembrar por estría e incubarla durante 24 h a 37°C para su crecimiento. Se aislaron, identificaron y se determinó su sensibilidad a CEM.

7.9Caracterización electromagnética del S.aureus

Para la caracterización EM del *Staphylococcus aureus*, se utilizó el programa de simulación Comsol Multiphysics.

COMSOL Multiphysics™ es una herramienta de modelado y análisis para prototipaje virtual de fenómenos físicos. Puede modelar virtualmente cualquier fenómeno físico. Es un paquete de software de análisis y resolución por elementos finitos para varias aplicaciones físicas.

Para la modelización de la bacteria se consideró una geometría esférica (citoplasma) de radio $0.792 \mu\text{m}$ rodeada de una membrana de espesor uniforme de valor 8 nm . La bacteria está inmersa en un medio externo (electrolito).

La caracterización eléctrica de la bacteria y del medio externo viene determinada por los parámetros eléctricos (permitividad eléctrica y conductividad) de las distintas capas de su estructura y del medio. Los valores se indican en la Tabla 3 (Aránzazu Sanchis Otero, 2008).

Tabla 3 Parámetros eléctricos (permitividad eléctrica y conductividad)

<i>Medio</i>	<i>Permitividad (ϵ)</i>	<i>Conductividad (S/m)</i>
Citoplasma	60	0.8
Membrana	16	$5e^{-8}$
Electrolito (medio externo)	80	$2.5e^{-3}$

Se observa que el citoplasma tiene una conductividad muy alta comparada con la membrana. Esto hace que la membrana sea un lugar de muy alta amplificación del campo eléctrico. (Aránzazu Sánchez Otero, 2008).

El sistema utilizado en COMSOL se formó por dos espiras de sección cuadrada $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, radio $R = 5.5 \mu\text{m}$, separadas una distancia $D = 12 \mu\text{m}$ por las que circula (en sentidos

contrarios) una densidad de corriente de valor $J_s = 22.5 \times 10^9 \text{ A/m}^2$, tal y se muestra en la Figura 8. Las espiras están encerradas en una esfera (región de radiación) de radio $R_e = 15 \text{ }\mu\text{m}$ rellena con el electrolito. Los valores de densidades de corriente utilizados permiten obtener una distribución de campo B prácticamente uniforme de valor 5 mT en toda la región ocupada por la bacteria, tal y como muestran las líneas de campo en la Figura 9y 10

2. Esfera

3. Bacteria

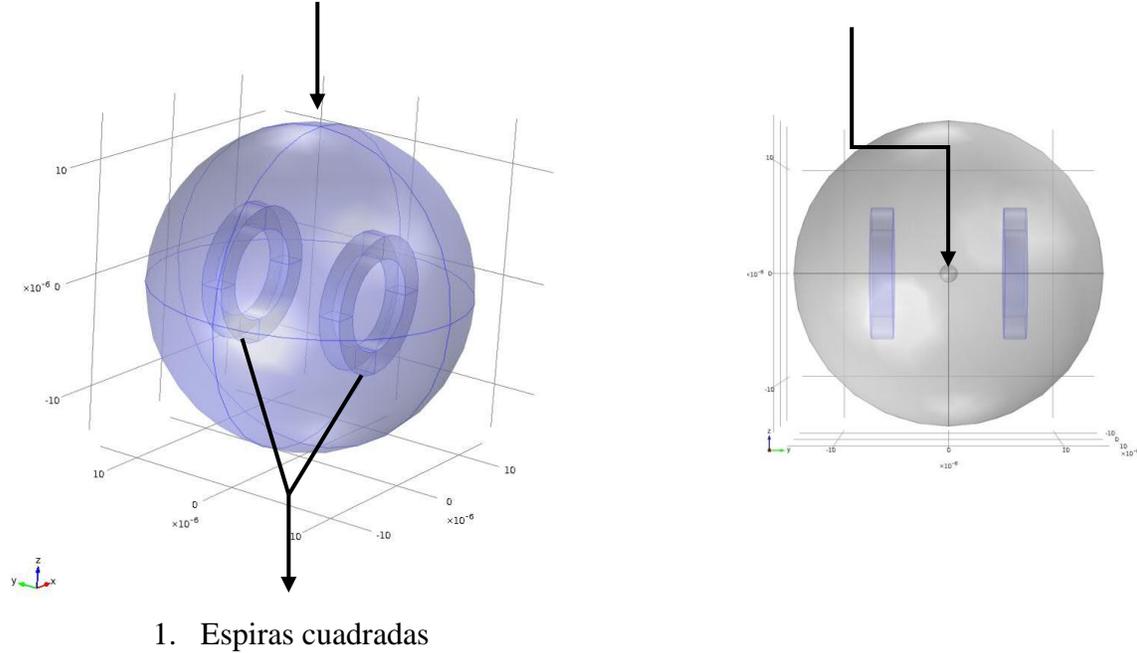
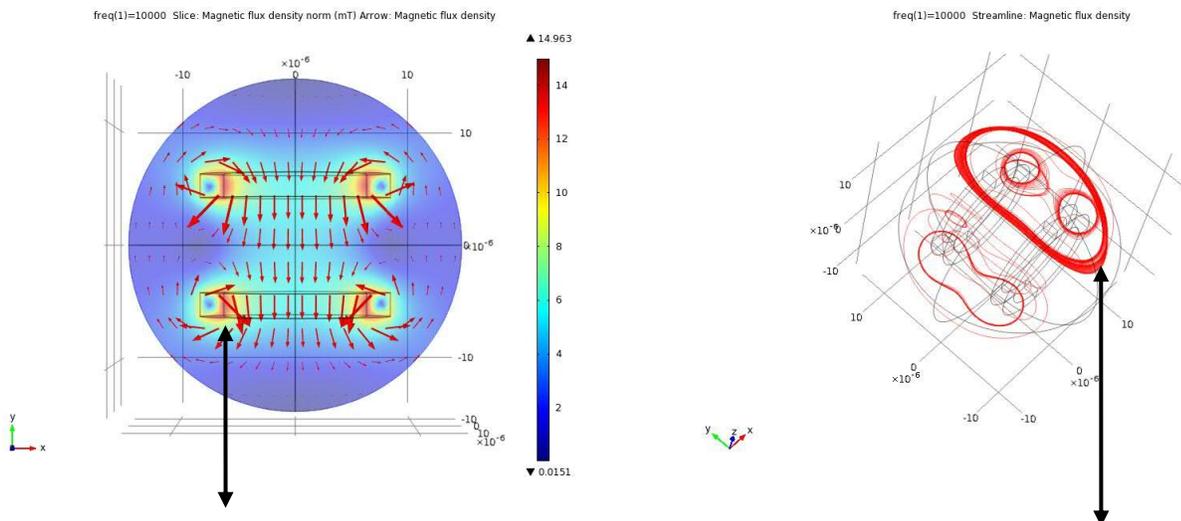


Figura 8 Aplicación del modelo teórico a la bacteria (región de radiación:1. espiras, 2.esfera, 3. bacteria)



Vectores de campo

Distribución de CEM en la bacteria

Figura 9 Distribución de campo electromagnético (vectores de campo).

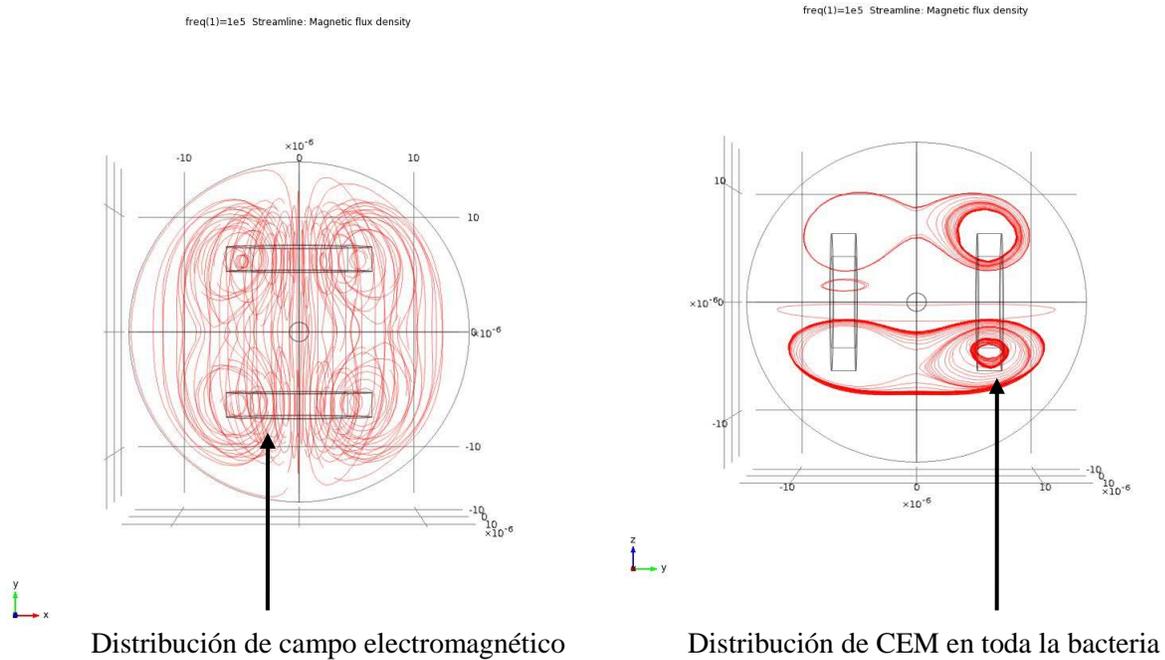


Figura 10 Distribución de campo en toda la bacteria.

7.10 Distribución de campo eléctrico y potencia electromagnética total disipada en el *Staphylococcus aureus*

El campo $B = 5 \text{ mT}$ y 18 mT de frecuencia variable entre 20 Hz y 10 MHz , se generó por medio de un sistema de bobinas de Helmholtz, tal y como se muestra en la Figura 10 y 11. La bacteria se sitúa en el centro del sistema, con el espacio de la región de radiación relleno de medio externo (electrolito). El intervalo de frecuencias estudiado cubre las frecuencias de los campos magnéticos generados por las líneas de distribución de energía eléctrica (50 –

60 Hz) y las frecuencias de campos utilizados en técnicas de manipulación de células (electroforesis, dielectroforesis y electrorotación).

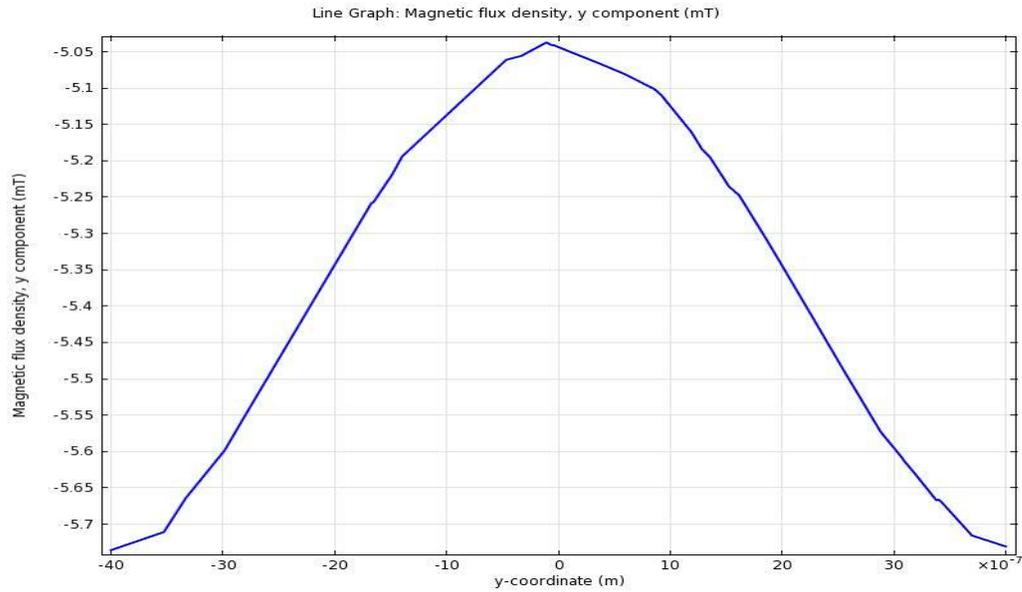


Figura 11 Distribución del campo eléctrico en la bacteria con intensidad de campo de 5 mT

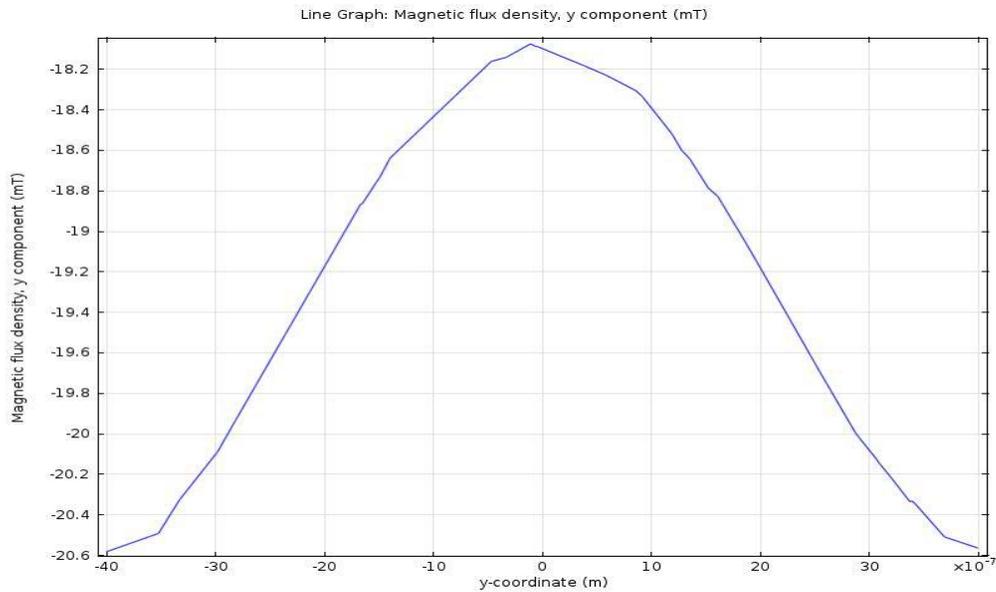


Figura 12 Distribución de Campo eléctrico en la bacteria con intensidad de campo de 18mT

Para obtener una buena precisión en los resultados numéricos para el campo eléctrico en las distintas zonas de la bacteria, se utilizó un mallado adaptativo, con distinta densidad de tetraedros para la membrana y para el citoplasma. Así, la membrana se dividió en 160.000 tetraedros con un volumen de mallado de $0.06038 \mu\text{m}^3$, mientras que para el citoplasma se utilizaron 357.000 tetraedros con un volumen de mallado de $2.08 \mu\text{m}^3$. Para la región de radiación se utilizó un mallado más grueso, formado por 470.000 tetraedros con un volumen de mallado de $1.114 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, El mallado adaptativo completo del sistema y de la bacteria se muestra en la Figura 13. (Distribución de densidad de campo magnético en el mallado adaptativo usando el método de elementos finitos).

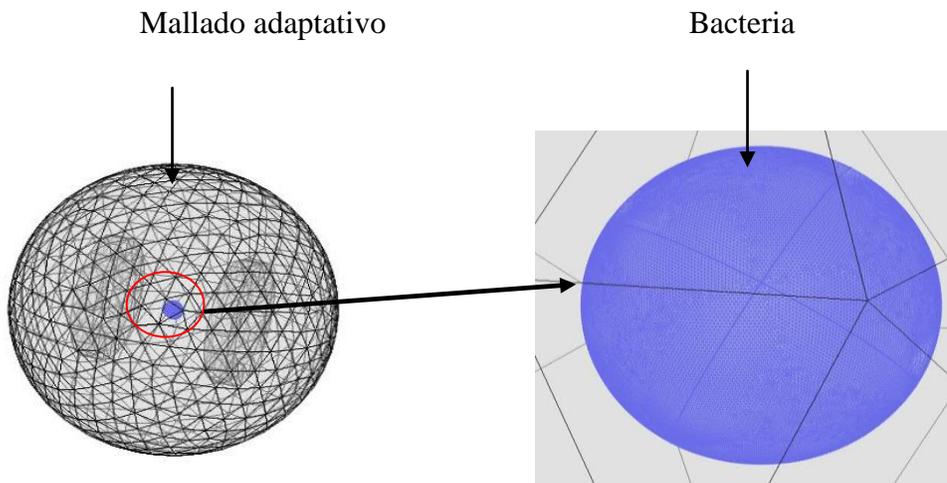


Figura 13. Mallado adaptativo del sistema y la bacteria
Análisis de elementos finitos en el mallado adaptativo

Para el análisis electromagnético, se calculó para distintos valores de la frecuencia, la potencia electromagnética disipada en el citoplasma, en la membrana y en el conjunto citoplasma - membrana del *Staphylococcus*, manteniendo la amplitud de campo B constante en 5 mT y 18mT.

Se usó el método de elementos finitos (MEF en castellano o FEM en inglés) es un método numérico general para la aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales parciales, asociadas a problemas físicos y biológicos complejos

VIIIANALISIS ESTADISTICO

El criterio para decidir si había efecto de los CEM sobre el crecimiento de las bacterias se basó en la prueba estadística de χ^2 considerando diferencia significativa si el valor de $p < 0.05$ al compara los valores de las mediciones de las bacterias con los obtenidos de bacterias tratadas con CEM. En todos los ensayos se aplicó este criterio:

- 1) Curva de crecimiento a diferentes tiempos.
- 2) Concentración de iones detectados mediante microscopía electrónica de barrido.

IX RESULTADOS

9.1 Determinación de la formación de biopelícula por el método de rojo congo

En la tabla 4 Se muestran los resultados de cepas que dieron positivo y negativo a formación de biopelícula, (Biopelícula (+) forma biopelícula ; Biopelícula (-) No forma biopelícula.

Cepas	Biopelícula (+)	Biopelícula (-)	Origen
54		(-)	Bacteria del pulque
94		(-)	Bacteria del pulque
3		(-)	Bacteria del pulque
71		(-)	Bacteria del pulque
69		(-)	Bacteria del pulque
60		(-)	Bacteria del pulque
45		(-)	Bacteria del pulque
ATCC <i>S. aureus</i>	(+)		Aislada de paciente
1986	(+)		Aislada de paciente
1654	(+)		Aislada de paciente
102	(+)		Bacteria del pulque
75	(+)		Bacteria del pulque
66	(+)		Bacteria del pulque
44	(+)		Bacteria del pulque

Tabla 4 Se muestra origen de las cepas estudiadas que dieron positivo y negativo a formación de biopelícula así como el origen de las mismas, biopelícula (+) forman biopelícula (cepas ATCC *S. aureus*, 1986, 1654, 102, 75, 6 y 44) biopelícula (-) no forma biopelícula (cepas 45, 60, 69, 71, 3, 94 y 54) .

En la figura 14 se presenta un ejemplo de bacteria productora de biopelícula.

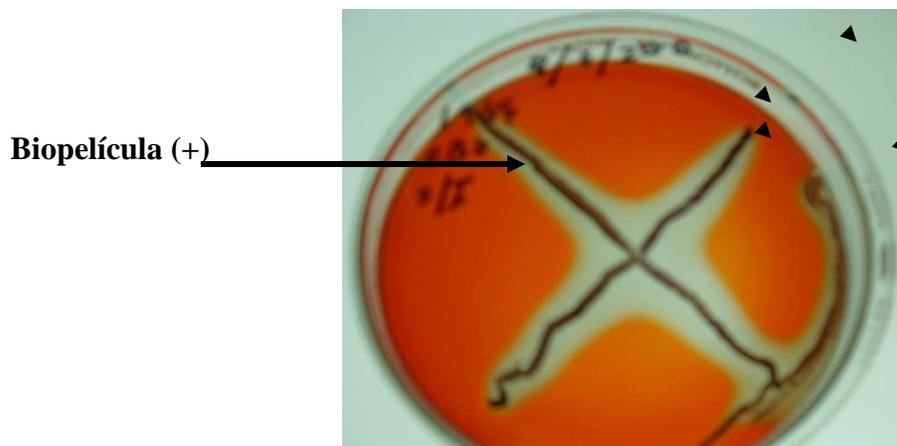


Figura 14 Ceba 1654 biopelícula (+)

De las cepas estudiadas se seleccionó la cepa 54 como control negativo y la cepa 1654 de *S. aureus* como control positivo, dado que estas dos cepas son las que dieron un mejor desarrollo y adaptación de su crecimiento en diferentes medios de cultivo. Las cuales se utilizaron como controles positivo y negativo respectivamente para ensayos posteriores.

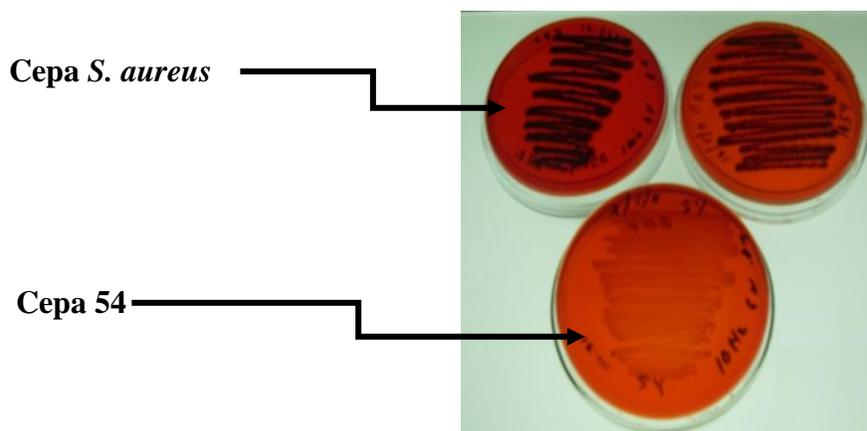
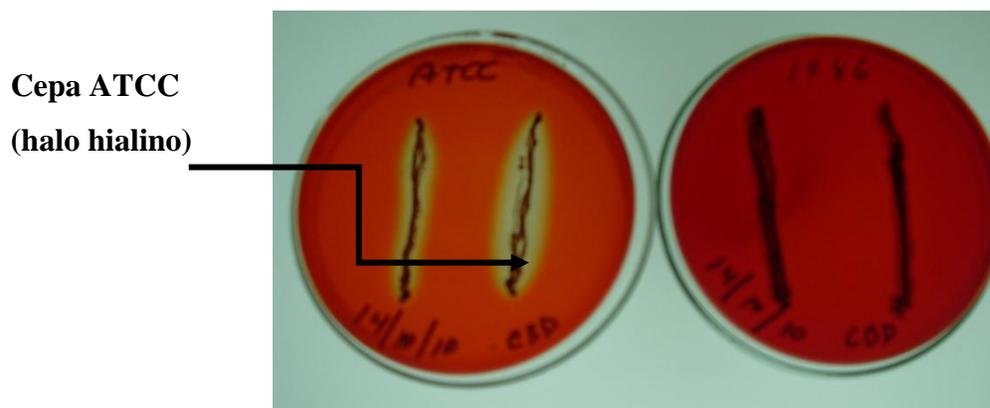


Figura 15. Bacterias formadoras o no formadoras de biopelícula (Cepa *S. aureus* forma biopelícula se observa de color negro, cepa 54 no forma biopelícula se observa de color café tenue).

Durante el crecimiento de las bacterias formadoras de biopelícula se observó un halo hialino alrededor de las colonias bacterianas con diferente distancia al exponer a CEM.

En la figura 16. Se observa que la cepa ATCC, izquierda además presenta el halo hialino que no se observó en el resto de las bacterias productoras de biopelícula.



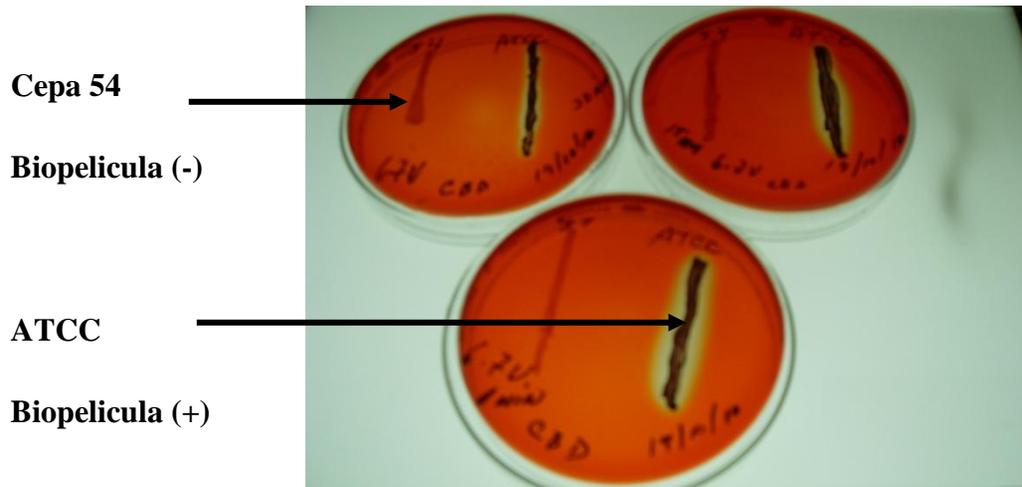


Figura 17 Comparación entre bacterias formadoras y no formadoras de biopelícula con Presencia de halo hialino de la cepa ATCC no así la cepa 54.

9.2 Efecto de los CEM sobre la formación de biopelícula

Una vez que se seleccionaron cepas formadoras o no formadoras de biopelícula, se decidió exponer a CEM para ver el efecto sobre la biopelícula. En este caso se emplearon las cepas 54 y ATCC de *S. aureus* respectivamente. A diferente frecuencia, tiempo de exposición y con una intensidad de campo de 5 mT y 3 A. En la tabla 7. Se muestran los resultados de CEM sobre la formación de biopelícula. A frecuencias de 10 a 30 Hz los tiempos de exposición fueron breves (1 y 5 min.), sin embargo 30, 50 y 60 Hz los tiempos variaron hasta 30 min los resultados representan las condiciones más extremas que se ensayaron ya que a 1 y 5 min tampoco se presentó un resultado distinto a lo observado; por tanto en éste resultado se observa que desde 1 min hasta 30 min de exposición y de 20 Hz hasta 60 Hz con la misma intensidad de campo los resultados fueron similares.

Tabla 5 Efecto de los campos electromagnéticos sobre la formación de biopelícula por cepa 54 y ATCC(*S. aureus*) a diferente frecuencia y tiempo de exposición

Frecuencia e intensidad de 5mT	Tiempo de exposición a CEM (min)	Cepa 54	ATCC
CEM de 10 Hz	1 min	No biopelícula, no halo	Halo de 2 mm. Biopelícula(+)
	5 min	No biopelícula, no halo	Halo de 2 mm. Biopelícula(+)
CEM de 20 Hz	1 min	No biopelícula, no halo	Halo de 5 mm Biopelícula(+)
	5 min	No biopelícula, no halo	Halo de 5 mm Biopelícula (+)
CEM de 30 Hz	1 min	No biopelícula, no halo	Halo de 2 mm Biopelícula(+)
	5 min	No biopelícula, no halo	Halo de 0.5 mm Biopelícula(+)
CEM de 50 Hz	1 min	No biopelícula, no halo	Halo de 4 mm Biopelícula(+)
	15 min	No biopelícula, no halo	Halo de 2 mm Biopelícula (+)
	30 min	No biopelícula, no halo	Halo 0 mm Biopelícula(+)
CEM de 60 Hz	1 min	No biopelícula, no halo	Halo de 2 mm Biopelícula(+)
	15 min	No biopelícula,	Halo de 1mm

		no halo	Biopelícula (+)
	30 min	No biopelícula, no halo	Halo de 0 mm Biopelícula(+)

9.3 Determinación de curva de crecimiento *Staphylococcus aureus*

Debido a que no se observó inhibición de crecimiento total de *S. aureus* en placa por la exposición de CEM, se investigó si podía causar una disminución parcial de su crecimiento, para ello se realizó una curva de crecimiento de *S. aureus* expuesto y no expuesto a los CEM por un periodo de incubación durante 36 h a 37°C.

En la Figura 18 Se observa que a partir de las 12 h de incubación se presenta una disminución en el crecimiento de *S. aureus* expuesto a CEM estadísticamente significativa, y que el máximo efecto inhibitorio se ve a las 24 h de incubación cuando lo cual indica un efecto inhibitorio en el crecimiento.

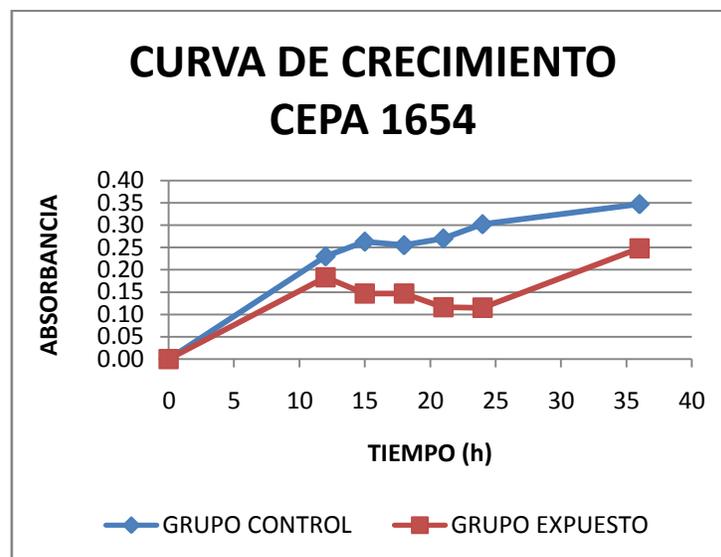


Figura 18 Curva de crecimiento de la cepa 1654 expuesta a campos electromagnéticos y el grupo control. Se aplicó una intensidad de campo de 5mT, 3 Amperes y una frecuencia de 50 Hz.

Tabla 6 Valores de la curva de crecimiento bacteria 1654 de *S. aureus*.

Tiempo (h)	Absorbancias 600nm	Absorbancias 600nm	Valor de P (10 repeticiones)
	Grupo control	Grupo CEM	
0	0	0	0
12	0.230	0.183	0.02 < p < 0.05*
15	0.263	0.147	P <<< .001*
18	0.255	0.147	P <<< .001*
21	0.270	0.116	P <<< .001*
24	0.302	0.115	P < .001*
36	0.347	0.248	P < .001*

Si $p \leq 0.05$ es significativo.

9.4 Efecto de los CEM sobre las bacterias productoras de caries

Una vez que se vio efecto inhibitorio de los CEM sobre el *S. aureus* se procedió a investigar el efecto de los CEM sobre las bacterias aisladas de pacientes con caries para ello los 20 aislados de microorganismos obtenidos de 16 pacientes con caries se sembraron cada uno por separado en medio de cultivo caldo nutritivo durante 24 h a 37C° en presencia o ausencia de una exposición a CEM tal y como se describe en material y métodos.

Tabla 7 Se muestra el total de cepas estudiadas tanto grupo control como grupo expuesto a campos electromagnéticos; en amarillo se presentan los resultados de crecimiento de las dos cepas de *S. aureus* empleadas como controles positivos. Observamos que hay una disminución del crecimiento de microorganismos tanto a las 18 h como a las

24 h de exposición a CEM en cada una de las cepas estudiadas. Sin embargo para el caso de las bacterias aisladas de pacientes el efecto es distinto.

En la Tabla 7 Se observa que 9 de las 20 cepas, es decir el 45 % son afectados por los campos electromagnéticos de manera significativa.

Paciente	Bacteria	Gram	Absorbancia 600nm(18 h)		Valor <i>p</i>	Absorbancia 600nm(24 h)		Valor <i>p</i>
			Ctrl	CEM		Ctrl	CEM	
p- 1	Cocos en racimo	+	0.194	0.123	$0.001 < p < 0.01$ *	0.231	0.209	$0.20 < p < 0.30$
p- 2	Diplococos	-	0.185	0.125	$p < 0.001$ *	0.224	0.194	$0.10 < p < 0.20$
P- 3	Diplococos-	+	0.180	0.107	$P < < 0.001$ *	0.228	0.195	$0.1 < p < 0.20$
P- 4	Cocos en cadena	+	0.168	0.128	$0.02 < p < 0.05$ *	0.244	0.179	$0.001 < p < 0.01$ *
P- 5	Cocos	+	0.268	0.218	$0.02 < p < 0.05$ *	0.408	0.380	$0.30 < p < 0.50$
P- 6	Diplococos	-	0.275	0.261	$0.50 < p < 0.70$	0.550	0.446	$0.001 < p < 0.01$ *
P- 7	Cocos en racimo	+	0.083	0.073	$0.30 < p < 0.50$	0.093	.083	$0.30 < p < 0.50$
P- 8	Cocos en racimo	+	0.056	0.043	$0.10 < p < 0.20$	0.068	0.053	$0.10 < p < 0.20$
P- 9	Cocos en racimo	+	0.051	0.040	$0.20 < p < 0.30$	0.067	0.054	$0.20 < p < 0.30$
P-10	Cocos en racimo	+	0.287	0.267	$0.30 < p < 0.50$	0.312	0.283	$0.20 < p < 0.30$
P-11	Diplococos	+	0.298	0.286	$0.50 < p < 0.70$	0.329	0.295	$0.10 < p < 0.20$
R0-5	Cocos	+	0.295	0.286	$0.70 < p < 0.80$	0.334	0.325	$0.70 < p < 0.80$
R0-2	Cocos en cadena	+	0.278	0.238	$0.05 < p < 0.10$	0.328	0.287	$0.10 < p < 0.20$
R0-1	Cocos en cadena	+	0.301	0.239	$0.001 < p < 0.01$ *	0.321	0.265	$0.02 < p < 0.05$ *
R0-3	Cocos en racimo	+	0.137	0.121	$0.30 < p < 0.50$	0.216	0.179	$0.05 < p < 0.10$
RE-4	Cocos	+	0.145	0.129	$0.30 < p < 0.50$	0.236	0.198	$0.05 < p < 0.10$
RE-2	Diplococos	+	0.159	0.145	$0.50 < p < 0.70$	0.162	0.159	$0.50 < p < 0.70$
RE-3	Cocos en cadena	+	0.195	0.185	$0.50 < p < 0.70$	0.232	0.176	$0.001 < p < 0.01$ *
P- 12	Cocos en racimo	+	0.197	0.188	$0.50 < p < 0.70$	0.239	0.179	$0.001 < p < 0.01$ *
RAZ	Cocos en cadenas	+	0.165	0.155	$0.50 < p < 0.70$	0.223	0.193	$0.10 < p < 0.20$

ATCC	Cocos	+	0.255	0.147	$P < < < 0.001^*$	0.302	0.209	$P < 0.001^*$
1654	Cocos	+	0.204	0.147	$0.001 < p < 0.001^*$	0.209	0.186	$0.005 < p < 0.10^*$

Si $p \leq 0.05$ es significativo

9.5 Efecto de los CEM sobre el crecimiento y formación de biopelícula en

S. aureus

Debido a que se observó inhibición de las 20 cepas aisladas de caries en presencia de CEM a 50 Hz, 5mT durante 24 h se decidió probar con mayor intensidad de campo electromagnético el cual fue de 18 mT, 10 kHz durante 24 h pero sólo para *S. aureus* (1654). Los resultados se muestran en la figura 19

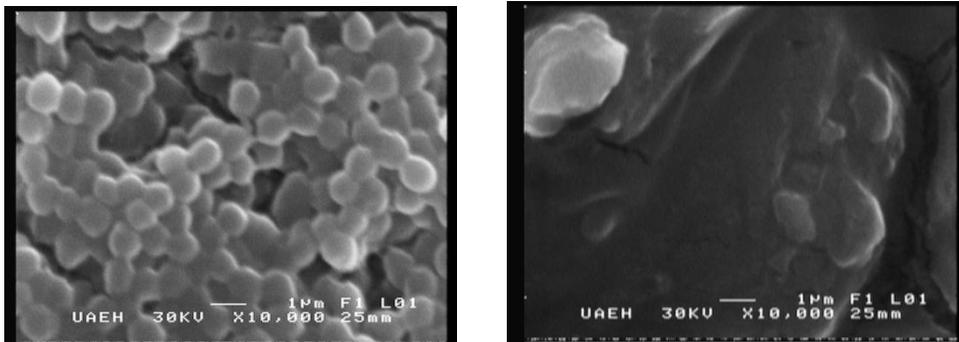


Figura 19 Microfotografía electrónica de barrido de una biopelícula *S. aureus* (cepa control) del lado izquierdo no expuesta a CEM comparada con microfotografía electrónica de una biopelícula *S. aureus* (cepa expuesta a CEM a frecuencia de 10 kHz 18 mT lado derecho).

Del lado izquierdo se observan bacterias esféricas agrupadas en racimos y del lado derecho no se observan bacterias.

9.6 Elementos presentes en la superficie de *S.aureus* sometida a tratamiento con CEM (frecuencia de 50 Hz, 5 mT)

En la Tabla 8 Se muestra el análisis de elementos presentes en la superficie del *S.aureus*, al ser expuesta a CEM a frecuencia de 50 Hz, 5mT. Se marca aumento de elementos Na, Fe, Al, O, N y una disminución de los elementos K, Ca y Mg.

Elemento	Control	CEM	Valor de <i>p</i>
K	1.23%	0.76%	$P < < < 0.001$ *
Na	5.50%	5.54%	$0.10 < p < 0.20$
Mg	2.00%	1.76%	$0.30 < p < 0.50$
Ca	5.50%	5.45%	$0.95 < p < 0.98$
Fe	0.14%	0.36%	$P < 0.001$ *
Al	0.90%	0.97%	$0.50 < p < 0.70$
O	31.13%	32.71%	$0.80 < p < 0.90$
C	35.95%	35.84%	$0.95 < p < 0.98$
N	14.84%	15.68%	$0.80 < p < 0.90$

Valores disminuidos por efecto de CEM

Valores aumentados por efecto de CEM

*Valores con significancia estadística

Se puede observar que se presenta inhibición total en una de las cajas de las bacterias expuestas a CEM y pérdida de la biopelícula en comparación con su control que no fue expuesto a campos electromagnéticos. Por otro lado en la tinción de Gram se observó que las bacterias expuestas a CEM presentaban zonas con halo blanco y rojizo.

Cepa 1654(control) Cepa 1654(expuesta a CEM)

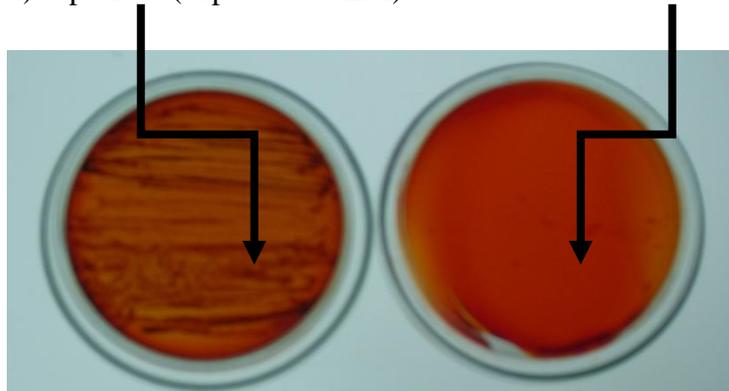


Figura 20 Cepa bacteriana (1654) expuesta a CEM con frecuencia de 10 kHz y 18 mT de lado derecho y su grupo control no expuesto de lado izquierdo, se observa la cepa control no expuesta a CEM con formación de biopelícula y la cepa expuesta a CEM se observa ausencia de biopelícula.

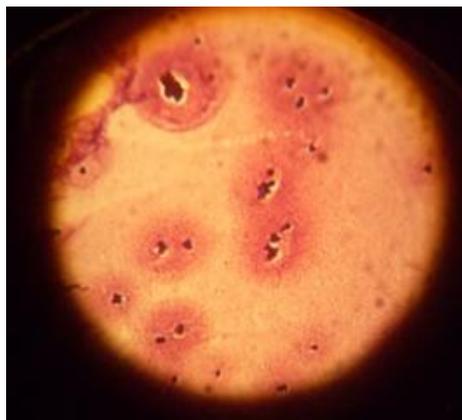


Figura 21 Tinción de Gram, cepa bacteriana 1654 expuesta a CEM a frecuencia de 10 kHz y 18 mT.(No se observan bacterias, no hubo formación de biopelícula sólo existía la presencia de elementos amorfos).

9.7 Efecto de los CEM sobre la morfología de *S.aureus*

Como se señalo antes los CEM inhibieron parcialmente el crecimiento de *S.aureus* las cuales fueron expuestas durante 24ha frecuencia de 50 Hz y 5 mT. Era importante saber a qué nivel celular se estaba produciendo el efecto para lo cual se utilizaron muestras de *S.aureus* expuestas y no expuestas a CEM para procesarlas y observarlas al MEB.(Figura 22)

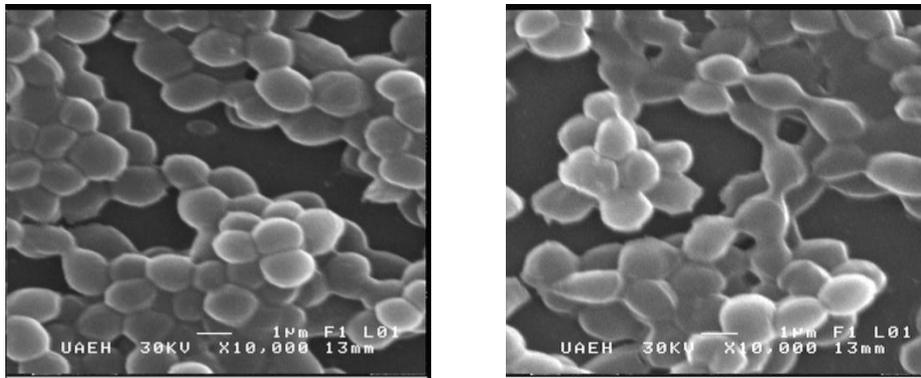


Figura 22 Microfotografía electrónica de barrido, cepa 1654 *S.aureus* (cepa control no expuesta a CEM lado izquierdo). Comparada con cepa expuesta a CEM a frecuencia de 50 Hz y 5 mT lado derecho. Se observan grupos de bacterias en racimos alargadas

En la imagen de las bacterias no se observan cambios morfológicos notorios sin embargo, el análisis de elementos señala que hay cambios a nivel de la superficie celular en cuanto a la presencia de iones. En el cuadro se muestra que cambia la concentración de Mg, Ca, Na, Fe y K.

9.8 Efecto de CEM sobre el crecimiento y formación de biopelícula de las cepas bacterianas productoras de caries

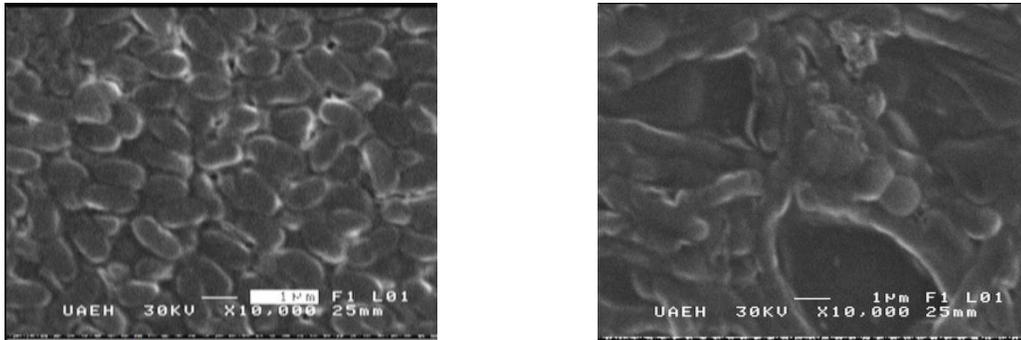


Figura 23 Microfotografía electrónica de una biopelícula oral obtenida mediante MEB Bacterias de paciente P-1, cocos Gram (+) cepa control a frecuencia de 10 KHz y 18 mT comparada con cepa expuesta a CEM de lado derecho, algunas bacterias se ven alargadas y otras amorgas.)

9.9 Elementos presentes en la superficie de bacterias de la caries sometidas a tratamiento con CEM a frecuencia de 50 Hz, 5 mT

Tabla 9 Análisis de los elementos presentes en la superficie de las bacterias productoras de caries sometidas a CEM a frecuencia de 50 Hz y 5 mT. Se marcan los elementos Na, Al, y O disminuidos y los elementos Mg, Ca, Fe y C aumentados.

Elemento	Control	CEM	Valor de p
K	0.12%	0.32%	$0.001 < p < 0.01$ *
Na	11.35%	10.16%	$0.80 < p < 0.90$
Mg	2.07%	3.05%	$0.80 < p < 0.90$
Ca	6.45%	7.12%	$0.80 < p < 0.90$
Fe	0.27%	0.46%	$0.02 < p < 0.05$ *
Al	1.45%	0.30%	$P < < < 0.001$ *
O	42.90%	38.95%	$0.50 < p < 0.70$
C	21.43%	25.25%	$0.50 < p < 0.70$
N	12.58%	12.76%	$0.90 < p < 0.95$

Valores disminuidos por efecto de CEM

Valores aumentados por efecto de CEM

*Valores significativos

Con la finalidad de investigar si los CEM modificaban la morfología de las bacterias y su composición superficial, se analizaron en MEB. Las muestras fueron expuestas durante 24 h bajo las siguientes condiciones; 10 kHz ,18 mT y 3 A. Los resultados de muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 Análisis de elementos de las bacterias de la caries expuestas a campos electromagnéticos a frecuencia de 10 kHz 18mT. Se marcan elementos aumentados por el efecto de CEM el Ca, Fe, y Cloro en las bacterias del paciente P-11 y P-5 y disminuidos el Al, Na, Mg, Fe C, O y N en los tres pacientes.

E	P-11 Ctrl	P-11 CEM	Valor <i>p</i>	P-5 Ctrl	P-5 CEM	Valor <i>p</i>	P-12 Ctrl	P-12 CEM	Valor de <i>p</i>
Na	11.35	10.1	0.70< <i>p</i> <0.80	7.10	11.06	0.30< <i>p</i> <0.50	8.55	6.52	0.50< <i>p</i> <0.70
Mg	3.24	3.05	0.90< <i>p</i> <0.95	2.44	2.89	0.80< <i>p</i> <0.90	2.60	2.25	0.80< <i>p</i> <0.90
K	0.12	0.32	0.001< <i>p</i> <0.01 *	0.63	0.23	<i>P</i> << 0.001 *	0.55	0.89	0.001< <i>p</i> <0.01 *
Ca	6.45	7.12	0.80< <i>p</i> <0.90	5.69	7.13	0.50< <i>p</i> <0.70	6.18	6.33	0.95< <i>p</i> <0.098
Fe	0.27	0.46	0.02< <i>p</i> <0.05	0.12	0.17	0.30< <i>p</i> <0.50	0.30	0.13	0.001< <i>p</i> <0.01 *
Al	1.45	1.27	0.90< <i>p</i> <0.95	1.08	1.40	0.80< <i>p</i> <0.90	1.06	1.13	0.95< <i>p</i> <0.98
Cl	0.08	0.52	<i>P</i> <<<0.001 *	0.20	0.27	0.30 < <i>p</i> < 0.50	0.18	0.19	0.90< <i>p</i> <0.95
C	21.43	25.2	0.50 < <i>p</i> <0.70	32.70	21.38	0.10< <i>p</i> <0.20	30.35	31.53	0.80< <i>p</i> <0.90
N	12.58	12.7	0.90< <i>p</i> <0.95	16.15	10.60	0.20< <i>p</i> <0.30	14.71	16.97	0.50< <i>p</i> <0.70
O	42.90	38.9	0.50< <i>p</i> <0.70	33.57	44.60	0.20< <i>p</i> <0.30	33.59	44.59	0.20< <i>p</i> <0.30

Valores aumentados por efecto de los CEM

Valores disminuidos por efecto de los CEM

*Valores significativos

En la tabla 11 Análisis de elementos de la bacteria 1654 expuesta a CEM a frecuencia de 10kHz y 18 mT se marcan elementos aumentados por efecto de los CEM como el Ca, Fe, y Cloro, disminuidos los elementos Mg, y K.

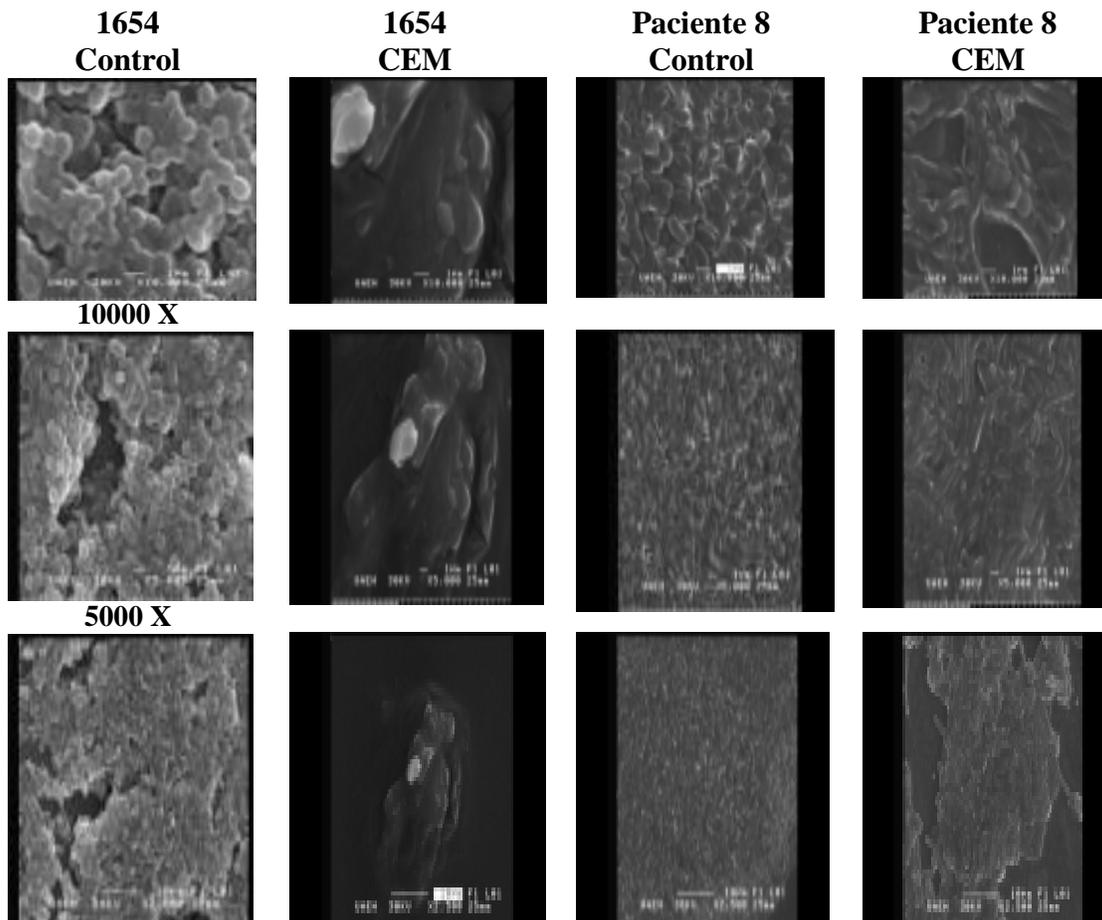
Elemento	1654 Ctrl	1654 CEM	Valor de <i>p</i>
Na	5.50	5.5	0.10<p<0.20
Mg	2.00	1.76	0.80<p<0.90
K	1.23	0.76	0.70<p<0.80
Ca	5.50	5.45	0.90<p<0.95
Fe	0.14	0.36	0.001<p<0.01 *
Al	0.90	0.97	0.50<p<0.70
Cl	0.21	0.60	P< 0.001 *
C	35.95	35.84	0.98<p<0.99
N	14.84	15.68	0.50<p<0.70
O	31.13	32.71	0.70<p<0.50

Si $p \leq 0.05$ es significativo (marcados en barra amarilla).

Valores aumentados por efecto de los CEM

Valores disminuidos por efecto de los CEM

En la Tabla 12 Se puede observar cambio en la morfología de la bacteria cuando esta se expone a frecuencia de 10kHz y 18mT en una imagen de 10 000 X. Son cepas bacterianas de *S. aureus*(cepa-1654) y de pacientes las fueron sometidas bajo las mismas condiciones de frecuencia e intensidad de campo. Se observa la cepa control bien delimitada cocos en racimo y las expuestas se ven alargadas.



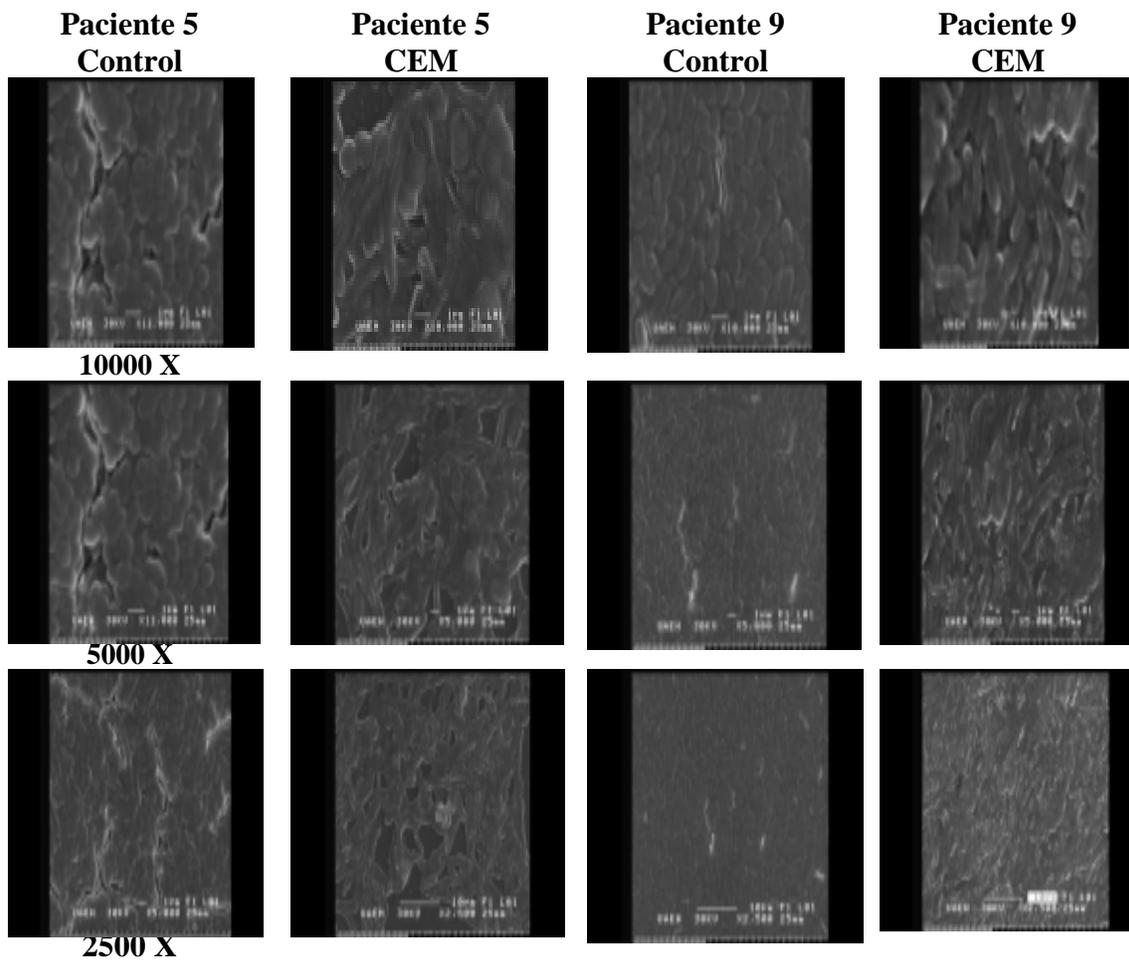
2500 X

Tabla 13 Microfotografía electrónica de barrido a diferente resolución (X10 000, X 5000 y X 2500 del grupo control y expuesto a CEM en las bacterias productoras de caries expuestas a una intensidad de campo de 18 mT y una frecuencia de 10kHz. (Cepa control

son cocos en racimos bien delimitados y agrupados la cepa expuesta se observan alargadas).

9.10 Efecto de CEM sobre *S.aureus* bajo simulación con el programa COMSOL MULTIPHYSIC

Para el análisis electromagnético, se calculó para distintos valores de la frecuencia, la potencia electromagnética disipada en el citoplasma, en la membrana y en el conjunto citoplasma - membrana del *Staphylococcus*, manteniendo la amplitud de campo B constante en 5 mT. Los resultados se muestran en la Figura 24

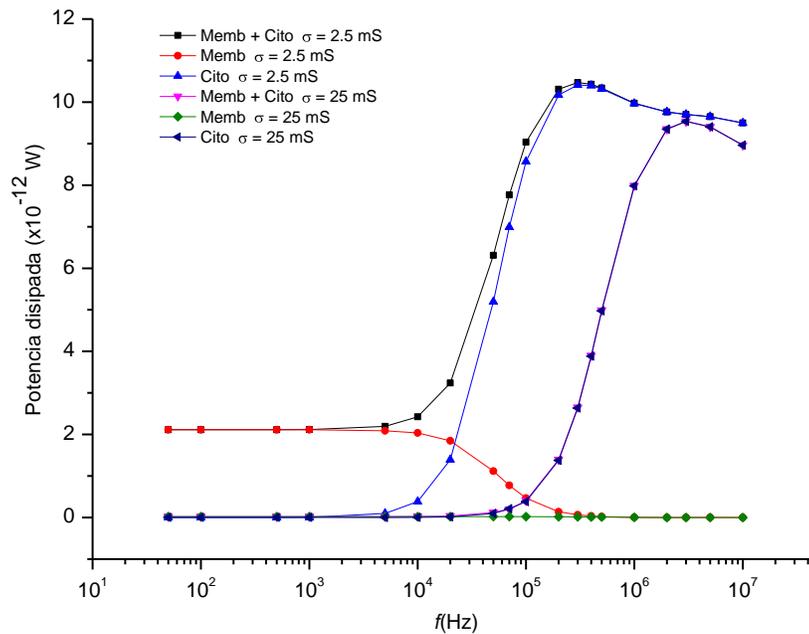


Figura 24 Análisis electromagnético a diferente frecuencia.

Se observa que en el orden de Hz la potencia se disipa en membrana y no así en el citoplasma ya que la potencia se alcanza a partir de kHz y MHz.

9.11 Análisis de la distribución de campo eléctrico

Como se puede observar, a frecuencia baja, la bacteria se comporta como una partícula conductora ya que la relación de la corriente de conducción a la corriente de desplazamiento ($\sigma/\omega\epsilon$) tiene un valor muy alto. En este caso las corrientes inducidas en la bacteria son muy débiles, el campo eléctrico en el citoplasma es muy pequeño por su alta conductividad y toda la potencia que se disipa es debida al campo eléctrico en la membrana que tiene una conductividad muy pequeña. Esto se pone de manifiesto en las curvas de potencia disipadas en el citoplasma y membrana. A medida que aumenta la frecuencia, se observa un incremento considerable en la potencia total disipada, correspondiendo la mayor parte a la disipada en el citoplasma, mientras que se reduce la potencia disipada en la membrana.

Este comportamiento se puede justificar si se tiene en cuenta las variaciones de amplitud del campo eléctrico en la membrana y en el citoplasma que se muestran en las Figura 25(a lo largo de un eje diametral de la bacteria) y Figura26 (con la frecuencia).

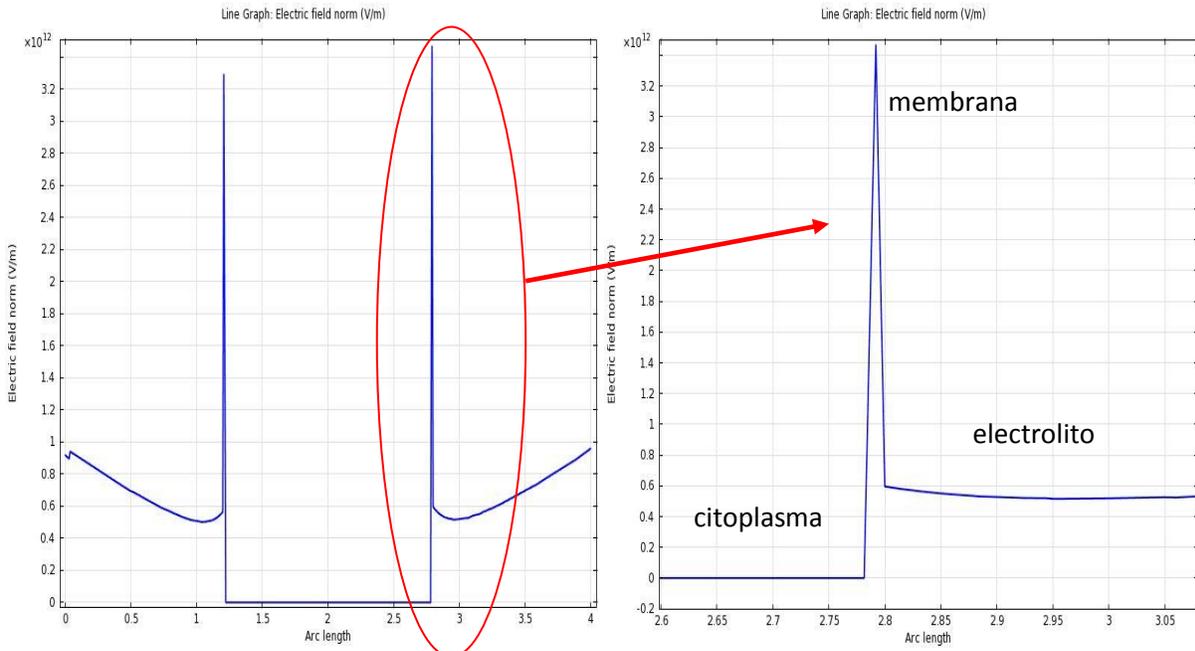


Figura 25 Variaciones de la amplitud de campo en membrana y en el citoplasma

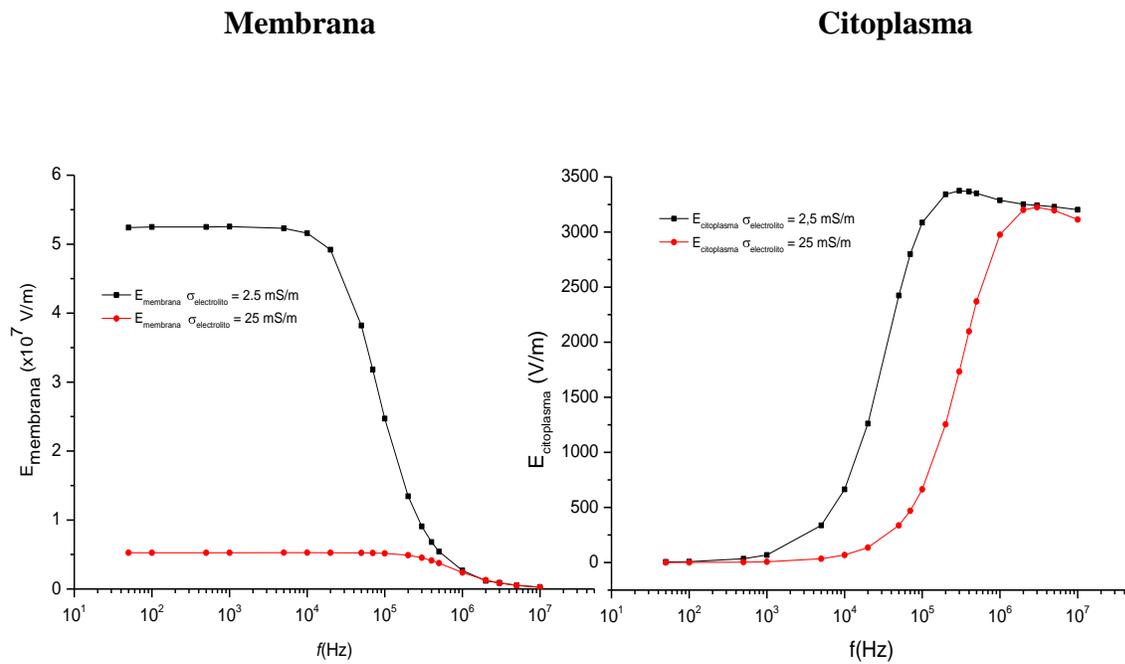


Figura 26 Variaciones de la amplitud de campo a diferente frecuencia

Se observa que a frecuencia baja (Hz) la amplitud del campo es en membrana no así en el citoplasma en donde la amplitud de campo se da en kHz y MHz .

X DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar si la aplicación de campos electromagnéticos podría influir en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de las bacterias productoras de caries ya que el crecimiento y la producción de biopelícula está asociada a enfermedad.

Una tecnología que ofrece promesas considerables en el campo de las infecciones es la aplicación de campos electromagnéticos. Varios estudios se enfocan en el efecto de los CEM sobre el crecimiento de bacterias. Strasák et al., 2005, reportó una disminución del crecimiento en diferentes cepas estudiadas las cuales fueron expuestas a campos electromagnéticos de 50 Hz a temperatura ambiente. Fojt et al., 2004, observó una disminución en el número de bacterias viables seguida a una exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia de 50 Hz. Los resultados obtenidos muestran también una disminución en el crecimiento bacteriano tanto del *S. aureus* como las bacterias productoras de caries expuestas a baja frecuencia de 50 Hz. Por otro lado se sabe que la gran mayoría de las bacterias en ambientes naturales están organizados formando biopelículas. Costerton, et al., 1995, Freeman, et al., 1989, Gaudio, et al., 2006. La biopelícula aparentemente no sólo es una organización sino también es un mecanismo de resistencia común en microorganismos Okajima, et al., 2006. Los resultados en este trabajo demuestran que la aplicación de CEM con una intensidad de campo de 18 mT expuestas durante 24 h produce inhibición de la biopelícula tanto del *S. aureus* como de las bacterias productoras de caries.

Para explicar la inhibición de biopelícula en *S. aureus* y de bacterias productoras de caries las cuales fueron expuestas a una frecuencia de 10 kHz y 18 mT en donde se incrementó la intensidad campo y los resultados fueron contundentes similares a los reportados por Piatti et al., 2002, quien reportó un efecto inhibitorio de crecimiento y una disminución del patógeno usando *Serratia marcescens* en la presencia de un campo magnético estático. Al

igual que Kermanshahi y Sailani 2005 reportaron una inhibición de microorganismos con campos eléctricos. Cellini et al., 2008, demostró que la exposición de *E. coli* a un campo electromagnético de 50 Hz actúa como un factor dirigido a cambios en su fenotipo y de transcripción. En este estudio se observó inhibición en el crecimiento de *S. aureus* así como las bacterias productoras de caries utilizando campos eléctricos de baja frecuencia a 50 Hz, 5 mT al ser expuestas durante 24 h y 10 kHz con una intensidad de campo de 18 mT donde se observó inhibición en el crecimiento y ausencia de biopelícula al ser expuestas a campos electromagnéticos. Lo anterior apoya los resultados obtenidos en ésta investigación en la que se demuestra que al menos a las condiciones trabajadas, es decir a 50 Hz, 5 mT, 3 A se pudo lograr una inhibición del crecimiento del *S. aureus* al aplicar estas mismas condiciones en las cepas bacterianas aisladas de pacientes se pudo alcanzar inhibición del crecimiento o por lo menos rezago del crecimiento en el 45 % de las bacterias estudiadas. Cabe señalar que las 20 bacterias no se aislaron de 20 pacientes ya que algunas fueron aisladas de un mismo paciente como es el caso de las bacterias de la RO (RO-1 a RO-5 y RE-2 y RE-3) el resto de las bacterias si provienen de un solo paciente. El resultado indica que de los 14 pacientes estudiados en 8 de ellos las bacterias causantes de sus caries fueron afectadas de manera significativa por los CEM. Este resultado nos hace pensar que los CEM son una buena alternativa para el control de bacterias productoras de caries. Los resultados fueron apoyados con los obtenidos con el modelo de predicción teórico “COMSOL MULTIPHYSICS”. En donde se demuestra que también bacterias como es el *S. aureus* son inhibidas mediante el uso de CEM.

Con respecto a dicha inhibición fue importante saber a que nivel celular se presentaba el efecto de los campos electromagnéticos. En este trabajo se demuestra que los CEM afectan la morfología de los microorganismos, lo cual se observa a la microscopía electrónica de barrido. Analizando la composición de elementos químicos en la superficie de las bacterias se pudo demostrar que los iones que son afectados corresponden a Ca, K, y Fe. Por un lado el calcio es un elemento que permite controlar señales externas y modificar el metabolismo de las células a través de canales, al igual que el potasio. En el caso del hierro es un elemento que también puede funcionar en citocromos relacionados con la respiración

celular. Si la bacteria se ve afectada a nivel de canales iónicos y en su respiración celular es posible que no reciba los estímulos necesarios ni la energía suficiente para su respiración.

En este trabajo de investigación podemos construir la siguiente explicación: Los CEM a condiciones de frecuencia de 10 kHz, 18mT son capaces de afectar la presencia de iones Ca, K, y Fe.

En por lo menos el *S. aureus* y en algunas de las bacterias aisladas de pacientes lo cual afecta el desarrollo o crecimiento de los microorganismos conduciendo a consecuencias letales dando por hecho una nueva alternativa de tratamiento contra la caries.

XICONCLUSIONES

- Los campos electromagnéticos inhiben el crecimiento del *Staphylococcus aureus* al ser expuestos a frecuencia de 50 Hz, 5 mT y 3 A, no así la inhibición de biopelícula debido a las variaciones de amplitud del campo eléctrico ya que la potencia total disipada se da sólo en membrana a frecuencia baja (Hz).
- Los campos electromagnéticos inhiben el crecimiento y formación de biopelícula al ser expuestos a frecuencia de 10kHz, 18 mT y 3 A. Debido a las variaciones de amplitud de campo eléctrico en donde la potencia total se disipa en membrana y citoplasma al aplicar una frecuencia alta e intensidad de campo.
- Los CEM también afectan morfológicamente a las bacterias, debido a que los campos magnéticos pueden activar las partículas coloidales del medio de cultivo haciendo que éstas remuevan parte del calcio unido a los fosfolípidos de la membrana plasmática, incrementando su permeabilidad y de esta forma afectando el crecimiento de los microorganismos.
- Los CEM inhiben o rezagan el crecimiento bacteriano hasta un 45% de manera estadísticamente significativa.
- El modelo teórico del programa “COMSOL MULTYPHYSICS” es congruente con los resultados obtenidos por lo que funciona como un modelo predictivo de aplicación CEM sobre el crecimiento bacteriano.
- Los CEM son una posible alternativa en el tratamiento de la caries, en base a los resultados obtenidos en donde se obtuvo inhibición en el crecimiento del microorganismo productores de caries y no formación de biopelícula a frecuencia de 10 kHz y 18 mT.

XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Aránzazu Sanchis O, A.P. Brown, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz, J.M. Miranda. Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis, *Bioelectromagnetics* 2009; p.75-80.
- 2 Andreas Obermeier, Florian Dominik Matl, Wolfgang Friess, Axel Stemberger. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* induced by-frequency electric and electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2009; 30:270-279.
- 3 Arteaga Hernández Gonzalo. Estudio Molecular de la resistencia contra vancomicina de cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de ojo humano 2009; p.24-25.
- 4 Adamkiewicz VW, Bassous C, Morency D, Lorrain P, Lepage JL. Magnetic response in cultures of *Streptococcus mutans* ATCC 27607. *Experimental Biology* 1987; 46:127-132.
- 5 Balan N, Ren D, Givskov M, Rasmussen TB. Introduction. In: Control biofilm infections by signal manipulation. Balaban N, Ed. Springer Series on Biofilms 2 USA 2008; p.1-11.
- 6 Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. In: Bacterial biofilms. Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 2008; 249-289.
- 7 Blakemore R, Frankel R. Magnetic navigation in bacterial. *Scientific American* 1981; p.245:58.
- 8 Bos R, van der Mei CH, Busscher JH. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions. Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23:179-230.

- 9 Bowen W.H. "Wither or wither caries research" *Caries Res* 1999;33:1-3.
- 10 Bothwell TP y Schwan HP. Electrical Properties of the Plasma Membrane of Erythrocytes at Low frequencies. *Nature* 1956; 178(4527): 265.
- 11 Cadossi R., F. Bersani, A. Cossarizza, P. Zucchini, G. Emilia, G. Torelli and C. Franceschi Lymphocytes and Low-Frequency Electromagnetic Fields. *The Faseb Journal* 1996;p.2667-2674.
- 12 Carstensen E y Marquis R. Passive Electrical Properties of Microorganisms. Conductivity of Isolated Bacterial Cell Walls. *Biophys J* 1968; 8(5): 536.
- 13 Castrillón Rivera Laura Estela y Col. Importancia de las biopelículas en la práctica Médica. *Dermatología Rev Mex* 2010;54(1):14-24.
- 14 Crane JS y Pohl HA .Theoretical Models of Cellular Dielectrophoresis. *Journal of Theoretical Biology* 1972; 37(1): 15.
- 15 Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Robuffo I, O, Trubiani O, Mariggio MA. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2008;29(4):302-311.
- 16 Crede, W. y Hierholzer W Jr. Linking Hospital epidemiology and quality assurance: seasoned concepts in a new role 1988; 9(1):42-44.
- 17 Collis CS, Segal MB .Effects of pulsed electromagnetic fields on Na fluxes across stripped rabbit colon epithelium. *J. Appl. Physiol* 1988;65:124-130.
- 18 Conti P, Gigante GE, Alesse E, Fieschi C, Reale M, Angeletti P. A role for Ca²⁺ in the effect of low frequency electromagnetic fields on the blastogenesis of human lymphocytes 1985;81:28-32.

- 19 Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanismo electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(12):2803–2809.
- 20 Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
- 21 Christensen, G., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barret F., Melton, D y Beachy, E. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates : a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical device. *J Clin Microbiol* 1985 ;22 (6):996-1006.
- 22 Diaz, R., Solorzano, S. y Padilla, D. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Pública Méx* 1999; 41(1):12-17.
- 23 Die Umschau. Magnetic field effects in chemistry and biology. *Jornal of chemical physics* 1984;2(26):779–783.
- 24 Dunne MW. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2)155-166.
- 25 Farina M, Lins H, Mottas D y Danon J. Microorganismes magnetotactiques de la region de Rio de Janeiro. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas-CBPF-039. Río de Janeiro, Brasil 1982;p.1-5.
- 26 Farina M, Lins H, Mottas D, Danon J Electron microscopy and ultrastructure of a magnetic microorganism. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. Rio de Janeiro. Brasil 1983;p.1-5.
- 27 Freeman, D., Falkiner, F. y Keane, C. New Method for detection slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Phatol*. 1989; 42(8):872-874.

- 28 Fricke H. A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems II. The Capacity of a Suspension of Conducting Spheroids Surrounded by a Non-Conducting Membrane for a Current of Low Frequency. *Physical Review* 1925; 26: 678.
- 29 Fricke H. The Electric Permittivity of a Dilute Suspension of Membrane-Covered Ellipsoids. *Journal of Applied Physics* 1953; 24: 644.
- 30 Fricke H. The Complex Conductivity of a Suspension of Stratified Particles of Spherical or Cylindrical Form. *Journal of Physical Chemistry* 1955; 59: 168.
- 31 Fojt L, Strasak L, Vetterl V, Smarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *S. aureus*. *Bioelectrochemistry- Proceedings of the XVIIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 2004; 63(1-2):337-341.
- 32 Galar-Castelan I. Electricidad y magnetismo para Estudiantes de Ciencias Biológicas. Editorial Limusa. 1ª. Edición. Mex 1988; p.223-237.
- 33 Gerencser VF, Barnothy MF, Barnothy JM. Inhibition of bacterial growth by magnetic fields 1962; *196*:539-54.
- 34 Goldsworthy A, Whitney H, Morris E. Biological effects of physically conditioned water. *Water Res* 1999; 33:1618-1626.
- 35 Goller CC, Romeo T. Environmental influences on biofilm development. In: *Bacterial biofilms*. Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 2008; 37-66.
- 36 Gorman SP, Jones DS. Biofilm complications of urinary tract devices. In: *Medical Implications of Biofilms*. Wilson M, Devine D, Eds. Cambridge University Press UK 2003; 136-170.

- 37 Halley,R., Culver, D. y White, J. The Efficacy on infection Surveillance and Control Programs in Preventing nosocomial infections in U.S Hospitals .Am J Epidemiology 1985;121(2):182-205.
- 38 Hall-Stoodley L, Costerton WJ, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004;2:95- 108.
- 39 Harkins, T.T. and Ch. B. Grissom. Magnetic Field Effects on B12 Ethanolamine Ammonia Lyase: Evidence For a Radical Mechanism. Science1994; 263:958-960.
- 40 Hewitt Addison Wesley. Física Conceptual,Longman (Editorial). Séptima reimpresión 1998;p. 616-629.
- 41Hidalgo-García. *Staphylococcus aureus* subespecie aureuscatalasenegative: un Nuevo caso en España.EnferInfeccMicrobiolClin 2011; p.2.
- 42Höber R. EinSweitesVerfahren Die LeitfähigkeitImInnern Von ZellenZuMessen. PflügersArch. ges. Physiol1912; 148: 189.
- 43 Huerta J. “Principios de Microbiología Bucal”. Ed. De la Universidad deChile 1975; pp. 23-33; 35-36; 42-45; 55-58.
- 44 Ikehata,T.Koana,Y.Shimizu,M.Nakagawa,Mutagenicity and comutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay. Mutation Research 1999;427,147-156.
- 45 Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm?FEMS MicrobiolLett 2004; 236: 163-173.
- 46Jennison M. The growth of bacteria, yeast and molds in astrong magnetic field. J. Bacteriol 1937; 33: 15-16.

- 47 Jiang X, Pace JL. Microbial biofilms. In: Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. Pace JL, Rupp M, Finch RG, Eds. CRC Press, USA 2006; 3(19-54).
- 48 Johari J, Hubner Y, Hull JC, Dale JW y Hughes MP. Dielectrophoretic Assay of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Physics in Medicine and Biology* 2003; 48(14): N193-N198
- 49 José E. Zapata M, Germán Moreno O. y Edna J. Márquez F. Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 2002;10(27).
- 50 Juárez, V., Reyes. L, Cancino, D., Muñoz, S., Rodríguez, M., Zavala, D. y Hernández, R. Insolation, vancomycin resistance and biofilm production of *Staphylococcus epidermidis* from patients with conjunctivitis, corneal ulcers, and endophthalmitis. *Rev Latinoamericana de Microbiología* 2006;48(3-4);238-246.
- 51 Keller L, Surette GM. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:249-258.
- 52 Kermanshahi RK, Sailani MR. Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2005;38(6):394-398.
- 53 Kohno M, Yamazaki M, Kimura II, Wada M. Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Pathophysiology* 2000;7(2):143-1.
- 54 K. Okuno, K. Tuchiya, T. Ano, M. Shoda. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperature, *J. Ferment. Bioeng* 1993;75,103-106.

- 55 Liboff A. Electric-field ion cyclotron resonance. *Bioelectromagnetics* 1997;18(1):85-87.
- 56 Liboff A. Cyclotron resonance in membrane transport. *Schwann Series A: Life Sc.* 1985;97: 281-296.
- 57 Lin J.C. *Advances in electromagnetic fields in living systems. Volume 1. First Edition.* Plenum Press. N.Y. 1994; p.18-20.
- 58 Lin J.C., Op. Cit. Los campos electromagnéticos ¿Un problema de salud pública? 2003;4:1.
- 59 Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2008; 64: 313-325.
- 60 L. Strašák, V. Vetterl, J. Šmarda, Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*, *Bioelectrochemistry* 2002;55:161-164.
- 61 Loeshe W.J. "Rol of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay". *Microbiol Rev* 1986;50: 353- 380.
- 62 Makarevich, A. V. Effect of magnetic fields of magnetoplastics on the growth of microorganisms, *Biophysics* 1999; 44:65-69.
- 63 Maret G, Dransfeld K. *Macromolecules and membranes in Ed. Salvat* 1986; p. 60-88.
- 64 Moore R. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. *Can J. Microbiol* 1979;25:1145-1151.
- 65 Nazar CJ. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 2007;67: 61-72.
- 66 O'Toole, G., Kaplan, H. B. Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiology* 2000;54: 49-79.

- 67 Osterhout WJV. Injury, Recovery and Death in Relation to Conductivity and Permeability, Lippincott, Philadelphia 1922.
- 68 Okajima, Y., Kobayakawa, S., Tsuji, A. y Tochikubo, T. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material 2006;47(7):2791-2795.
- 69 Palavecino, E. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*. Nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. Rev. Chil Infect 2002; 19(2):119-124.
- 70 Pohl HA. The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields. Journal of Applied Physics 1951; 22: 869.
- 71 Pohl HA. Dielectrophoresis the Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric fields. Cambridge (1978).
- 72 Pérez Medina Gabriela Effect of weak Magnetic fields on bacterium *Staphylococcus aureus* Dep.de Física ,Universidad de Zulia, Venezuela 2010;1:p.77-87.
- 73 P. Cario, B. Greenebaum and E. M. Goodman, Magnetic field exposure enhances RNA expression of σ^{32} in *E. coli*. J. Cell. Biochem 1998;68, 1-7.
- 73 Parker S.P. Encyclopedia of Physics. Second Edition. McGraw-Hill, USA 1993;p.337-339.
- 74 Patrick R. Murray, Michael A.P Faller. Microbiología Médica, Elsevier España 2006; pp.8, 214, 739, 919.
- 75 Plínio Lázaro Faleiro Naves. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su confactores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas 2009;p.41-46.

- 76 Pothakamury U.R., B.J. Barletta, G.V. Barbosa y B.G. Swanson. Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes. Revista Española de Ciencia y Tecnología de alimento 1993;33:479-489.
- 77 Pothakamury U, Barbosa G, Swanson B Magnetic Fields Inactivation of Microorganisms and Generation of Biological Changes. Food Technology 1993; 47:p.85-93.
- 78 Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vivo biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impacto environmental and genetic factors. J Bacteriol 2006; 188: 3572-3581.
- 79 Rogers CG, Cole KS. Heat Production by Eggs of *Arbacia Punctulata* during fertilization and Early Cleavage. Biological Bulletin 1925; 49: 338-353.
- 80 Sauer K, Rickard AH, Davies DG. Biofilm and biocomplexity. Microbe 2007;7:347-353
- 81 Strasak L, Vetterl V, Smarda J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. Bioelectrochemistry 2002;55(1-2):161-164.
- 82 Stewart J.R. The electrostatic and electromagnetic effects of A.C. transmission Lines. IEEE.U.S.A.1979;p.4-10.
- 83 Stewart SP, Franklin JM. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol 2008; 6:199-210.
- 84 Schneider, T. y Zeitz, M. bakterielleinfektione. En: Die Infektiologie. (Ed) Adam, D, y cols. Springer, Alemania 2004; p.p. 913-1117.
- 85 Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol 2002;56:187-209.
- 86 Schulten K, Weller A. Magnetic field effects in chemistry and: Why magnetic fields can influence biochemical systems 1984;46: 585-598.

- 87 Sturdevant. C, Roberson.T and H.Heymann.“Operatoria Dental Arte y Ciencia”. 3ª Ed. 1996;p.223-228.
- 88 Sutherland WI. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences.Pure&ApplChem 1997;69:1911-1917.
- 89 Sutherland WI. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:3-9.
- 90 Tenke P, Kovacs B, Jäckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology.World J Urol 2006; 24: 13-20.
- 91 Tipler, Paul A., Gene Mosca. “Física para la Ciencia y la Tecnología : Electricidad y Magnetismo” 5ª Ed. 2005; 2: p.824
- 91 Turner, M., R. W. Clough, H.C. Martin y L.J. Toop, "Stiffness and Deflection Analysis of Complex Structures" J. Aeronautical Science 1956; 23: 805-823.
- 92 Urzúa. I y Stanke. F.“Nuevas Estrategias en Cariología: Factores de Riesgo y Tratamiento “ 1999; pp. 13-30; 39-45; 50-52; 59-61.
- 93 Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. EnfermInfeccMicrobiolClin2008; 26: 48-55.
- 94 William, A. Petri.Antimicrobianos. Las bases farmacológicas de la terapéutica J.G.Hardman. L. E. Limbierd. McGraw Hill, México 2002; pp:1279-1282.
- 95 Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbio Rev 2000;24:661-671.
- 96 Wood R. Magnetismo: De la brújula a los imanes superconductores. 1ª. Edición. McGraw-Hill. Capítulo 12 Biomagnetismo 1991;p.165-173.

- 97 Zapata M, José E, Moreno O, Germán y Márquez F, Edna J. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *saccharomycescerevisiae* 2002; 46: 127-132.
- 98 Zapata JE, Hoyos Ramírez M. "Acción de un campo magnético sobre el cultivo aireado de *Saccharomycescerevisiae*." *Interciencia* 2005;30:409-413.

XIII ANEXOS

13.1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

En pleno uso de mis facultades mentales autorizo a la C.D.Carmen Balderas D. para que se me haga un aislamiento de microorganismos en mis caries con la finalidad de contribuir en el proyecto de investigación “Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento y formación de biopelícula de microorganismos productores de caries”.

Es mi deseo trabajar en el protocolo de investigación por lo que autorizo se realice un aislamiento bacteriano en las caries diagnosticadas.

NOMBRE DEL PACIENTE

TESTIGO

TESTIGO

NOMBRE DEL INVESTIGADOR

C.D. CARMEN BALDERAS D.

FECHA