

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL Monterrey, Nuevo León



“IDENTIFICACIÓN DE CELULOSA PROVENIENTE DE BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL RAMAN, ESTUDIO IN VITRO.”

^aRomero Rodríguez Erika del Carmen, ^aDucoing Hernández Francisco Javier, ^aMéndez González María Verónica, ^bAraujo Andrade Cuauhtémoc, ^cFausto Reyes Claudio, ^aGonzález Amaro Ana María.

^aMaestría en Endodoncia, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. anamara75@hotmail.com

^bInstituto de Metalurgia, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. araujoa@uaslp.mx

^cCentro de Investigaciones en Óptica, A.C (Unidad Aguascalientes). cfraus@cio.mx

1.- INTRODUCCIÓN:

La observación de los microorganismos en forma de biofilm es tan antiguo como la Microbiología en general, y la microbiología médica en la que ahora es totalmente aceptada, debido a su asociación con distintas infecciones, como lo son las infecciones endodónticas¹.

La estructura del biofilm nos explica porque los microorganismos han sobrevivido durante miles de años, es gracias a esa estructura, que actúa como una barrera mediante la cual los microorganismos adquieren protección y sobreviven a los ataques del ambiente exterior, incluyendo antibióticos, o el propio sistema de defensa del huésped².

2.- TEORÍA:

Justificación: Sabiendo que el biofilm puede presentarse bajo ciertas condiciones en infecciones endodónticas y debido a las características propias del biofilm así como de su capacidad de resistencia, es importante su estudio, que en su mayoría han sido orientados a su eliminación o disgregación³.

Sin embargo, hay estudios recientes en los que se ha llevado a cabo la caracterización de sus componentes orgánicos in vivo, en los que se ha reportado un elevado porcentaje de celulosa, por lo que es importante el estudio de sus componentes mayoritarios y reproducir la formación de celulosa, a través de un modelo in vitro para que de esta manera sea posible el estudio de su disgregación⁴.

Pregunta de investigación: ¿Es posible identificar celulosa procedente de un biofilm in vitro de *E. faecalis* mediante Espectroscopía Vibracional Raman?

Objetivo General: Identificar celulosa mediante Espectroscopía Vibracional Raman de biofilm de *E. faecalis* in vitro.

Objetivos específicos:

- Formación de biofilm monoespecie in vitro con *E. faecalis* de cepa silvestre por medio de flujo continuo.
- Análisis del biofilm mediante Espectroscopía Vibracional Raman.
- Observación del biofilm mediante Microscopio Electrónico de Barrido.

Diseño del estudio: Experimental in vitro.

Criterios de selección:

Inclusión: Raíces de dientes humanos de reciente extracción	Exclusión: Raíces calcificadas Raíces con ápices abiertos	Eliminación: Separación de instrumento Raíces con dos conductos
--	---	---

VIII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



Variables:

<p>Independiente: Formación de biofilm in vitro</p> <p>Definición Conceptual: Comunidades de microorganismos monoespecie y multiespecie embebidos en una matriz de exopolisacáridos</p> <p>Definición Operacional: Elaboración de un sistema de goteo flujo continuo para la elaboración de biofilm en ápices de dientes extraídos</p> <p>Escala de medición: Categórica nominal</p>	<p>Dependiente: Identificación de celulosa</p> <p>Definición conceptual: La celulosa es un biopolímero lineal β- (1-4)-D-glucopiranososa. Es la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza</p> <p>Definición operacional: Obtención de espectros mediante Espectroscopia Vibracional Raman.</p> <p>Escala de medición: Categórica nominal</p>
--	--

Consideraciones Éticas: En el manejo de los residuos generados se siguieron los criterios de los residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) de acuerdo a la NOM-052-SEMARNAT-1993 y NOM-087-SEMARNAT SSA1-2002. En base a lo anterior, el presente proyecto fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Facultad de Estomatología de la UASLP con la clave CEI-FE-060-015

3.- PARTE EXPERIMENTAL:

Materiales y Métodos: Se utilizaron 40 raíces de dientes humanos de reciente extracción, las cuales se esterilizaron para su posterior utilización, en estas piezas se formó biofilm por flujo continuo con cepas silvestres de *E. faecalis*; esto se realizó simultáneamente en condiciones anaerobiosis como en un ambiente de aerobiosis en la cámara de flujo laminar, para lo cual se siguió la metodología reportada por González y col. 2014.



El sistema de flujo continuo se mantuvo durante 14 días, para la formación del biofilm, posterior a esto se analizaron las muestras.



Imágenes representativas del tercio apical de las muestras radiculares, previo a la formación de biofilm, y posterior a la formación de biofilm, tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, para la observación de sus características macroscópicas.

VIII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



Las mediciones se realizaron con un microscopio óptico (LEICA DMLM) que se encuentra integrado al sistema micro-Raman de Renishaw, modelo 1000B

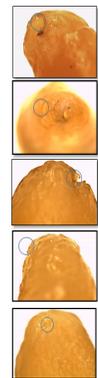
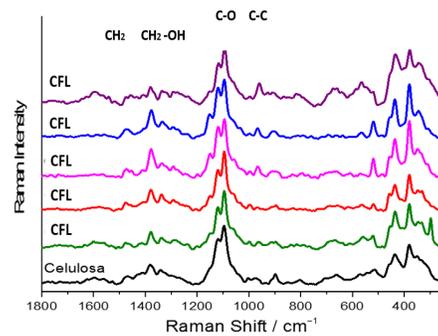
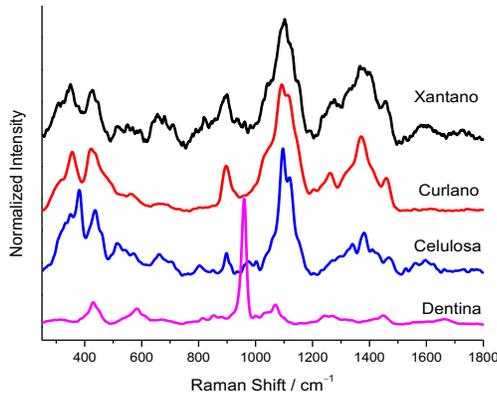
Para iniciar la toma de espectros se realizó una calibración del sistema micro-Raman usando como referencia la banda de silicio cristalino en 520 cm^{-1} .⁵



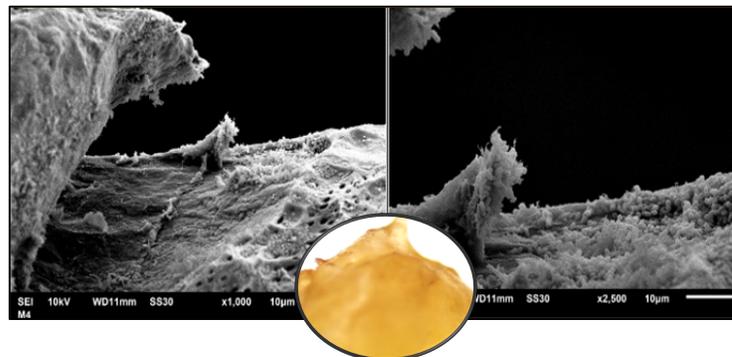
La longitud de onda del láser de excitación fue de 830 nm (cercano infrarrojo) y fue dirigida hacia la muestra utilizando el objetivo $50\times$ del microscopio incorporado al sistema Raman. La potencia del láser sobre la muestra fue de 12.5 mW , con un tiempo de exposición de 30 segundos sobre la muestra.⁵

En promedio 10 espectros fueron tomados para cada una de las muestras de ambos sistemas (aerobio y anaerobio) en un rango espectral de $100\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$

Los espectros obtenidos fueron corregidos en su línea base, con el fin de eliminar la contribución de la fluorescencia. Así mismo se descartó el espectro de dentina como composición química del biofilm.⁵



Aleatoriamente 4 piezas fueron seleccionadas para ser observadas al Microscopio Electrónico de Barrido, de las cuales 2 correspondientes al grupo de anaerobiosis y 2 al aerobiósis.



VIII

CONGRESO
NACIONAL DE
TECNOLOGÍA
APLICADA A
CIENCIAS DE
LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS
DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



4.- RESULTADOS:

Las imágenes obtenidas mediante Microscopio Electrónica de Barrido, pudieron evidenciar la presencia de un biofilm sólido, en ambas condiciones además por medio de Espectroscopía Vibracional Raman, se pudo demostrar que la celulosa es el componente mayoritario de este biofilm.

5.- CONCLUSIONES:

En este proyecto, fue posible reproducir a través de un modelo de formación *in vitro* un biofilm sólido, que posee las mismas características tanto morfológicas, como estructurales independientemente del ambiente anaeróbico o aeróbico en el cual sean formados, ya que se logró identificar que ambos presentaron celulosa como componente mayoritario.

BIBLIOGRAFÍA

1. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections Niels Høiby Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet and the Costerton Biofilm Center, University of Copenhagen, Copenhagen Denmark.
2. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33 (8): 1387-1392.
3. Jhajharia K, Parolia A, Shetty V, Mehta L. Biofilm in endodontics: A Review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Jan-Feb; 5(1): 1–12.
4. Karunaratne ND, *The Complex World of Polysaccharides*, Chapter 13 Publisher: InTech, Chapters published on October 31, 2012.
5. Wentrup-byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM. Fourier Transform Raman Microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1997; (28): 151-158.