



CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y SU ORGANIZACIÓN EN FORMA DE BIOFILM EN ÁPICES RADICULARES EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS.

Luis Antonio Hernández Ayala ^a, Ana María González Amaro ^b,
Ricardo Oliva Rodríguez ^b, Claudia Butrón Téllez Girón ^c

^a Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, antoniohdzAyala9@gmail.com

^b Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, anamara75@hotmail.com, ricardoolivardz1@hotmail.com

^c Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología, Facultad de Estomatología,
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, poly97bu@hotmail.com

RESUMEN

La anatomía de los conductos radiculares favorece la colonización microbiana en los últimos cinco milímetros apicales, donde los microorganismos tienen la capacidad de organizarse en forma de biofilm, el conocimiento de estos es importante ya que el éxito del tratamiento endodóntico radica en el tipo de microorganismos y su forma de organización. Por lo que el objetivo de este estudio fue identificar a los microorganismos causales de infecciones primarias, secundarias y su organización en forma de biofilm. Para realizar este estudio se recolectaron ápices con infección primaria y secundaria, se colocaron en tioglicolato enriquecido con hemina y menadiona, posteriormente fueron llevados a la cámara de anaerobiosis de 48 a 72 hrs se procedió a identificar a los microorganismos por medio de pruebas enzimáticas API 20A (Analytical Profile Index; Biomerieux, France) y el API 20 STREP (Analytical profile index: Biomerieux, France), y preparación del ápice para su observación al Microscopio Electrónico de Barrido. Se identificaron y analizaron los microorganismos de ambas infecciones, haciendo una comparación entre ellos, el microorganismo con mayor incidencia en las infecciones primarias fue el *Enterococcus faecium*, mientras que en las infecciones secundarias fue el *Actinomyces israelii*. Se observó en el Microscopio Electrónico de Barrido las distintas formas de desarrollo y el comportamiento del biofilm intraradicular así como interforaminal y extraradicular. Los microorganismos con mayor frecuencia en ambas patologías fueron del género *Enterococcus* y *Streptococcus* y los cuales mostraron organización en forma de biofilm en sus diferentes fases de maduración.

1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral cuenta con diferentes tipos de nichos ecológicos como lo son mejillas, paladar, lengua, superficie de los dientes, encías y saliva contando cada uno con su propio ecosistema, además la composición de la microbiota oral varía según el tipo de superficie específica, lo que demuestra que las pequeñas diferencias en el hábitat pueden afectar a la capacidad de especies individuales para colonizar y dominar. Es muy amplia la gama de factores de importancia ecológica que influyen directamente en la actividad y composición de los microorganismos en los distintos tipos de hábitat presentes en cavidad bucal. La cavidad bucal es altamente selectiva para la adquisición de su microbiota a partir del nacimiento y de ello resulta una comunidad microbiana característica, esta flora bacteriana cambia con la edad del huésped, lo que nos indica que los microorganismos en un ser humano de 5 años no son los mismos que en uno de 50 años. Para que los microorganismos puedan afectar a la pulpa se ha mencionado que la caries dental es la razón fundamental para producir procesos infecciosos, así mismo en segundo nivel de importancia las enfermedades periodontales pueden ser el camino por el que lleguen bacterias a la pulpa. Otras causas de infección pulpar son la colonización bacteriana a través de los márgenes de obturación, la exposición pulpar directa de origen traumático o iatrogénica, rompe la barrera física impuesta por las estructuras dentinarias poniendo la pulpa en contacto con el ambiente de la cavidad oral. La caries dental si no es tratada a tiempo puede necrosar la pulpa dental causando una infección odontológica fenómeno que ocurre con frecuencia, tanto en los dientes no tratados (infección primaria) y los

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



dientes que han sido sometidos a un tratamiento de endodoncia (infección secundaria). Por otra parte, la placa dental es un biofilm bien organizado que se adhiere a la superficie del diente, donde la boca le brinda los factores ideales para su desarrollo, por mencionar algunos se encuentra la humedad, la temperatura y las superficies adecuadas, la diversidad de estos microorganismos es sumamente amplia y a menudo se llevan a cabo relaciones mutualistas. El biofilm intrarradicular es un biofilm formado sobre la dentina del conducto radicular en dientes que presentan infecciones endodónticas, estando adyacente en el cemento radicular y en el ápice radicular. El biofilm extrarradicular ha sido reportado en dientes con periodontitis periapical asintomática y en dientes con absceso apical crónica asociados con lesiones persistentes. La compleja anatomía de los conductos radiculares como son los conductos accesorios, laterales, secundarios, istmos y deltas apicales favorecen la colonización microbiana en los últimos cinco milímetros apicales. Existen reportes que indican que el éxito de los tratamientos en infecciones primarias es de un 90 a 94% y en infecciones secundarias de un 76 a 81% y esto radica en el tipo de microorganismos y su modo de organización en forma de biofilm, por lo que es interesante el conocimiento de los microorganismos presentes tanto en infecciones primarias como secundarias, así como su organización en dentina y en cemento radicular.

2. OBJETIVO

Identificar a los microorganismos de infecciones primarias y secundarias, así como su organización del biofilm en el tercio apical.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de U.A.S.L.P., con clave **CEI-FE-013-016**. Y los RPBI (Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos) se trataron según lo señala la Norma Oficial Mexicana **087-ECOL-SSA1-2012**.

Obtención de muestra. Se recolectaron primeros molares superiores e inferiores donde estuviera indicado tratamiento de conductos, pero que por cuestiones personales el paciente decidió por la extracción o con diagnóstico de infección endodóntica secundaria, siendo el tratamiento de igual manera la extracción de igual modo se recolectaron los ápices de las raíces mesiales de los primeros molares superiores e inferiores con diagnóstico de infección endodóntica secundaria, siendo el plan de tratamiento la apicectomía. Una vez obtenido el órgano dentario se limpió con abundante suero fisiológico y gasas estériles con el fin de eliminar restos de tejido y sangre, posteriormente se seccionó con un disco de diamante de baja velocidad (sunburst Micro-motor modelo SC-80 Chung Song IND Co.) 35,000 RPM, el corte se realizó transversal al eje longitudinal del diente a la altura del tercio apical.

En cuanto los dientes indicados para cirugía endodóntica se obtuvo la porción apical y fue lavada con abundante suero fisiológico y gasas estériles con el fin de eliminar restos de tejido y sangre. La porción apical se colocó en el tubo de tioglicolato enriquecido, se colocó en la cámara de anaerobiosis marca COY LABORATORY PRODUCTS con una atmósfera de 85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂ a una temperatura de 35°C +/- 2° C en un periodo de incubación de 48-72 hrs. Posteriormente se realizó descargas por duplicado en placas de Agar CDC y se llevaron a la incubadora (Mini Incubator, Labnet) a una temperatura de 35°C +/- 2° C en un periodo de incubación de 48 horas, consecutivamente se observó y describieron las características macroscópicas, y se realizó tinción de Gram para su observación microscópica, ya diferenciadas las colonias se procedió a ser un cultivo puro para identificarlas por medio de pruebas enzimáticas API 20A (Analytical Profile Index; Biomeriëux, France) y el API 20 STREP (Analytical profile index: Biomeriëux, France).

Para la lectura al microscopio electrónico de barrido (MEB), las muestras fueron lavadas tres veces con solución buffer fosfato pH 7.02 +/- 0.2 (HYCEL de México, S.A. de C.V.) para su observación al microscopio estereoscópico LEICA EZ4 D (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Germany) a 35x aumentos, Se realizaron los pasos de fijación de las muestras (glutaraldehído/azul de alciano), Deshidratación de las muestras (alcoholes), Secado de punto crítico (CO₂), Recubrimiento (oro) para las lecturas al microscopio electrónico de barrido (Philips XL 30, EEUU) a bajo kilovoltaje (5 Kv).

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 Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 10 órganos dentarios, cinco con infección primaria y cinco con infección secundaria. A la identificación se encontraron mayor número de microorganismos en las infecciones secundarias, siendo en su mayoría cocos en ambas infecciones (Tabla 1.) y bacilos. En las infecciones primarias se identificaron un total de 11 microorganismos diferentes, de los cuales el que más prevaleció fue el *Enterococcus faecium* con un 21%, seguido del *Streptococcus intermedius* y el *Lactococcus lactis* con 3 identificaciones cada uno obteniendo de esta manera un 15.7%., en las infecciones secundarias se identificó a 15 microorganismos diferentes. Los microorganismos con mayor incidencia fueron *Actinomyces israelii* y la *Listeria spp* con un 13.63%.

Tabla 1. Identificación de microorganismos y Gram de infecciones primarias y secundarias.

Infecciones Primarias		Infecciones Secundarias	
Microorganismos	Gram	Microorganismos	Gram
<i>Enterococcus faecium</i>	Coco +	<i>Enterococcus faecium</i>	Coco +
<i>Streptococcus intermedius</i>	Coco +	<i>Streptococcus intermedius</i>	Coco +
<i>Listeria spp</i>	Bacilo +	<i>Listeria spp</i>	Bacilo +
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coco +	<i>Enterococcus faecalis</i>	Coco +
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Coco +	<i>Veillonella párvula</i>	Coco -
<i>Aerococcus viridans 1</i>	Coco +	<i>Streptococcus porcinus</i>	Coco +
<i>Streptococcus costellatus</i>	Coco +	<i>Streptococcus intermedius</i>	Coco +
<i>Veillonella atypica</i>	Coco -	<i>Streptococcus mitis</i>	Coco +
<i>Lactococcus lactis</i>	Coco +	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Coco +
<i>Aerococcus urinae</i>	Coco +	<i>Streptococcus agalactia</i>	Coco +
<i>Enterococcus avium</i>	Coco +	<i>Enterococcus avium</i>	Coco +
		<i>Bifidobacterium</i>	Bacilo +
		<i>Aerococcus viridans</i>	Coco+
		<i>Actinomyces naesiundi</i>	Coco +
		<i>Actinomyces israelii</i>	Bacilo +
Total de 11 microorganismos		Total del 15 microorganismos	

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



Cinco microorganismos se identificaron en infecciones primarias como en secundarias entre los que predominó el *Enterococcus faecium*. El *Streptococcus intermedius* presentó una mayor frecuencia en las infecciones primarias y la *Listeria spp* en las infecciones secundarias. La presencia de estos microorganismos en infecciones primarias como en secundarias mostró que puede existir sobrevivencia de estos al tratamiento de conductos y que no son exclusivos de una infección.

El microscopio electrónico de barrido mostró que en las infecciones primarias que los microorganismos se empiezan a agrupar para formar posteriormente una matriz donde se apreció un conglomerado tridimensional de microorganismos, apreciándose canales de comunicación muy bien definidos, así como una gran cantidad de fibras largas y cortas. En conjunto se pudo ver la presencia de una matriz de exopolímeros en vías de convertirse en un biofilm maduro, en cuanto a las infecciones secundarias la presencia de un biofilm maduro en conducto principal como conductos accesorios estaban colonizados por microorganismos, de igual manera se observó un conducto secundario.

En este estudio los microorganismos identificados en los ápices con infección primaria fueron menos que los identificados en los ápices con infección secundaria, esperaríamos que este resultado fuera distinto, sin embargo coincidimos con otros estudios, donde reportan que los cambios en el ambiente intra conducto, así como los nutricionales o químicos como el incremento en el pH por el hidróxido de calcio o el efecto de antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento de conductos, son capaces de disparar una cascada genética para que expresen fenotipos diversos que modifica las características fisiológicas de las células bacterianas, por lo cual el nicho ecológico presente en una infección primaria previa a la endodoncia es distinto al que presenta una infección secundaria.

Los resultados obtenidos son corroborados con otros estudios donde se encontró un gran predominio de cocos Gram positivos anaerobios facultativos hasta en un 82% en las infecciones primarias y un 73% en las infecciones secundarias, de igual manera los géneros de *Streptococcus* (24%) y *Enterococcus* (20%) obtuvieron mayor frecuencia en ambas infecciones, sin embargo diferimos en cuanto al predominio de los *Lactobacillus spp*, ya que nosotros no identificamos a este microorganismo, por el contrario encontramos amplio predominio de los *Lactococcus lactis* presente con un 15.70% el cual solamente se identificó en las infecciones primarias.

Existen diversos estudios en los que se le atribuye la presencia de la biopelícula extrarradicular a la posible invasión bacteriana proveniente del conducto radicular infectado, formando biofilm en este sitio el cual analizaron por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB) y confirmando que las estructuras presentes son causa de un largo periodo de tiempo en formación y no por causa de contaminaciones durante el procesamiento de las muestras. Coincidiendo con este estudio ya que se encontró durante la observación de las muestras al MEB el desarrollo de un biofilm extrarradicular completamente maduro el cual recubría toda la superficie externa en las muestras con infección secundaria sin mencionar el biofilm interforaminal que se observó en el interior de los conductos secundarios y accesorios.

La compleja anatomía intrarradicular es uno de las principales causas en el fracaso de las endodoncias que se liga a las limitantes físicas que presentan los instrumentos endodónticos, ya que actualmente no se ha reportado un método endodóntico que estudie o reporte la eliminación del biofilm en la región de los istmos.

5. CONCLUSIÓN

Los microorganismos que se encuentran en las infecciones endodónticas con mayor frecuencia son del género *Enterococcus* y *Streptococcus*, los cuales se encuentran organizados en forma de biofilm en sus diferentes fases de maduración embebidos en exopolímeros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol., Vol 43, 11, 2005, pp.5721-5732.
2. Ricucci D, Pascon EA, Ford TR, Langeland K. Epithelium and bacteria in periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, Vol 101, 2, 2006, pp. 239-249.
3. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent., Vol 37, 1, 2009, pp. 76-81.



CCADET
"CALIDAD EN SALUD"



UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NUEVO LEÓN



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. Chavez De Paz L, Dahlen G, Molander A Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.*, Vol 36, 7, 2003, pp. 500-508.
5. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research.*, Vol 89,3, 2010, pp.652-662.
6. Signoretti FGC, Endo MS. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: Scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *Journal of Endodontics.*, Vol 37, 12, 2011., pp. 696-700.
7. Hiyari S, Bennett KM. Dental diagnostics: molecular analysis of oral biofilms. *J Dent Hyg.*, Vol 85, 4, 2011., pp. 256-63.
8. Dufour D, Laung V, Levezque C. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics.*, Vol 22, 2012, pp. 2-16.