

EG
90537

M.
A 973 D
2007



**UNIVERSIDAD DE VALPARAISO.
FACULTAD DE ODONTOLOGIA.
ESCUELA DE GRADUADOS.
CATEDRA DE ENDODONCIA.**



**Detección de *Enterococcus* sp, y *Fusobacterium* sp.
en conductos Radiculares con Necrosis Pulpar y lesión Periapical, con la utilización de el
método (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Trabajo de Tesis para optar al grado de
Magister en Ciencias Odontológicas con
Mención en Endodoncia.

Residente: Maria J. Ayala Sardúa.
Tutor: Dr. Gastón. Zamora Álvarez

Valparaíso-Chile 2007.

DEDICATORIA.

*A Dios, por darme la gracia
y el entendimiento necesario para
Culminar esta investigación.*

*A mis Padres, por el apoyo
y ayuda incondicional.*

*A mi Esposo, por la fuerza
que me dio en los momentos difíciles.*

*Y en Memoria, de Victoria Fernández
“vicky” Por inspirarme a realizar
este trabajo, que seguro a ella
le hubiese gustado culminar.*

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Gastón Zamora, por su ayuda desinteresada y el apoyo necesario, para hacer posible esta investigación.

Al Dr. Luís Moya, por ayudarme en la culminación de este trabajo, y por todos los conocimientos aportados.

Al Sr. Luís Lizama, Jefe de Investigación y desarrollo en el laboratorio BIOSCAN, por su valiosa cooperación y ayuda durante la ejecución de este trabajo.

Al laboratorio BIOSCAN, por realizar un eficiente trabajo al evaluar las muestras.

A José Manuel Divo, mi esposo, por su incondicional ayuda durante la realización de esta investigación.

INDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEORICO	
2.1. Antecedentes Microbiológicos de las Enfermedades Endodónticas.....	4
2.1.1. Microbiología de los Procesos Endodónticos.....	4
2.1.2. Vías de entrada de los Microorganismos e Infección de los Conductos Radiculares.....	6
2.1.3. Determinantes Bioquímicas de la Virulencia de la Microbiota Endodóntica.....	11
2.1.4. Respuesta del Huésped ante la Agresión Microbiana.....	14
2.1.5. Causas Microbianas de la Inflamación Endodóntica.....	19
2.2. Técnicas de Medición e Identificación de Microorganismos.....	24
2.2.1. Status Bacteriológico del Conducto Radicular con lesiones Perirradiculares.....	24
2.2.2. Desarrollo de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	31
2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	33
2.2.4. ADN Polimerasa.....	38
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	39
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSIÓN.....	50
7. CONCLUSIONES.....	58
8. SUGERENCIAS.....	59
9. RESUMEN.....	60
10. BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTADO DE ABREVIACIONES

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
- E. coli: Escherichia coli.
- E.D.T.A: Ácido Etilendiamino Tetraacético.
- E faecalis: Enterococcus faecalis.
- F. nucleatum: Fusobacterium nucleatum.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IL: Interleucinas.
- LPS: Lipopolisacáridos.
- Mg: Magnesio.
- NaOCl: Hipoclorito de Sodio.
- Ng: Nanogramo.
- PAF: Factor Activador de Plaquetas.
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Taq: Termus aquaticus.
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

1. INTRODUCCION.

Durante la ejecución del tratamiento endodóntico, es necesario la selección de técnicas de limpieza, preparación, modelado, materiales y técnicas de obturación, apropiados para mantener el sistema de conductos radiculares libre de microorganismos. Pero existe un hecho indiscutible, sin la invasión microbiana de la pulpa y de los tejidos periapicales asociados, no sería necesario el tratamiento endodóntico, (excluyendo las indicaciones protésicas). En 1890 Miller señaló, que gran parte la patología pulpar estaba directa o indirectamente relacionada con microorganismos. Hace más de 30 años Kakahashi y cols, demostraron que sin la intervención bacteriana, las pulpas expuestas sólo sufren una ligera inflamación.

En la actualidad para poder planificar y ejecutar un tratamiento endodóntico adecuado, es necesario conocer, cuales son los microorganismos presentes dentro del espacio pulpar en infecciones endodónticas, la capacidad destructiva de los mismos, los requisitos necesarios e indispensables para el crecimiento bacteriano, cada una de las vías de entrada hacia la pulpa, la sensibilidad que presentan a los fármacos, sus dependencias con otros microorganismos y su relación con la sintomatología y manifestaciones clínicas. Esto conduce, a detectar la presencia bacteriana en el interior de los conductos tanto en procesos inflamatorios pulpares, como en dientes con pulpa necrótica y lesiones periapicales, y hace necesario para el estudio el empleo de un control bacteriológico eficiente.

Los abscesos pulpares, las lesiones periapicales, la hinchazón y el dolor, son consecuencias de infecciones bacterianas mixtas. El descubrimiento de los bacilos anaeróbios gram negativos y de sus relaciones con otros microorganismos en las infecciones mixtas, demuestran la relación tan estrecha que existe entre las ciencias básicas y la práctica clínica, en el campo específico de la Endodoncia.

Los primeros trabajos para tratar de identificar estas bacterias dieron resultados algo engañosos, debido a fallas en los métodos de detección y en las muestras de cultivo, que no permitían aislar e identificar las bacterias anaerobias presentes en pulpas y en zonas periapicales infectadas, estos métodos son significativamente problemáticos, además, no hay que excluir el hecho de que existen microorganismos viables pero no cultivables capaces de causar enfermedades, por lo que los procedimientos de cultivos ofrecen una inadecuada identificación bacteriana. De la misma forma estos métodos convencionales pueden sugerir un agente etiológico, no suministran evidencia de una especie en particular en la infección.

Un importante cambio en la identificación bacteriana, ocurre en el año de 1990, con los avances de la genética molecular, cuando comienzan a ser utilizados nuevos métodos para la detección de bacterias en las enfermedades endodónticas. Desde entonces nuevos patógenos putativos endodónticos han sido revelados, y se ha confirmado la asociación de algunas bacterias anaeróbias con la etiología de enfermedades perirradiculares. Además, se ha comprobado que la diversidad de la microbiota endodóntica es mucho más compleja de lo que se esperaba, y que un elevado porcentaje de esa microbiota está compuesta por especies todavía no cultivables.

Durante la última década, los métodos de genética molecular han sido utilizados para la identificación de bacterias en muestras clínicas sin la necesidad de medios de cultivos. Estas técnicas han mostrado ser más rápidas y sensibles que los métodos convencionales, además, permiten obtener mayor precisión para identificar patógenos presentes en infecciones endodónticas. En los últimos años, la técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido exitosamente utilizado en la identificación de microorganismos y específicamente en el área de la microbiología endodóntica por demostrar alta especificidad y exactitud al momento de brindar resultados. Por otra parte, ha permitido mejorar el nivel de conocimiento sobre la patogénesis de la enfermedad periradicular e identificar por primera vez, la prevalencia de diferentes especies bacterianas y de otras nunca antes encontradas en los conductos.

2.1 ANTECEDENTES MICROBIOLÓGICOS DE LAS ENFERMEDADES ENDODONTICAS

2.1.1 MICROBIOLOGÍA DE LOS PROCESOS ENDODÓNTICOS.

La endodoncia es la disciplina que estudia la etiología, la etiopatogenia y el tratamiento de las enfermedades de la pulpa y los tejidos periapicales. La terapia endodóntica, está dirigida a la eliminación de los microorganismos y a la prevención de la reinfección, y mantiene una estrecha relación con la microbiología.

La pulpa dental es un tejido conjuntivo, que se encuentra en el interior de una cámara de dentina, y se relaciona con el área periapical a través de un agujero apical. La porción coronal del diente, está recubierta de esmalte y la porción radicular de cemento. La integridad del esmalte y de la dentina protege a la pulpa y constituye una barrera física que, no obstante, al estar encerrada en el interior, le impide la distensibilidad. Por otra parte a través del agujero apical, la pulpa presenta una limitada comunicación vascular y nerviosa con el resto del organismo. Estos dos hechos, junto con la ausencia de una circulación colateral eficaz, determinan una importante dificultad para la reparación de los distintos cuadros inflamatorios que tienen lugar en la pulpa (Cohen y Burns, 2002).

Los irritantes que afectan la pulpa pueden ser microbianos, térmicos, mecánicos, químicos o eléctricos. La Pulpitis es una inflamación de la pulpa. Después de un primer daño en la pulpa pueden ocurrir dos cosas: transcurrido algún tiempo las lesiones desaparecen y la pulpa se

destruye gradualmente y por último, se necrosa. Cuando la pulpa se infecta, da lugar al desarrollo de una lesión inflamatoria en los tejidos periapicales, denominada periodontitis apical.

Las pulpitis y la periodontitis apical, pueden ser agudas o crónicas y la evolución de la enfermedad suele ser variable. Los microorganismos orales, son la causa más frecuente de la infección pulpar (Negroni, 2004). Se ha demostrado, que los microorganismos desde el canal radicular, pueden invadir lesiones periapicales endodónticas y establecer enfermedades infecciosas (Sunde, 2002).

Se debe tener presente que, en condiciones normales, la integridad de los tejidos duros dentarios (esmalte, dentina y cemento radicular), protegen a la pulpa, de la infección por microorganismos. Por otra parte, la Microbiología es esencial, para entender el tratamiento endodóntico, cuyos objetivos primordiales; son la eliminación de los microorganismos en los conductos radiculares e impedir la contaminación de los tejidos periapicales, mediante una obturación eficaz (Cohen y Burns, 2002).

Entre todas las ciencias básicas, la Microbiología es la que guarda una relación estrecha con la práctica de la endodoncia. La gran mayoría de las infecciones de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares, guardan relación con microorganismos. Tras la invasión microbiana de esos tejidos, el huésped responde con defensas tanto inflamatorias inespecíficas como inmunológicas específicas. El tratamiento endodóntico quirúrgico y no quirúrgico son en esencia, procedimientos de desbridamiento destinados a destruir y eliminar el ecosistema microbiano, asociado con el proceso patológico. Es importante que los clínicos comprendan la íntima relación

entre la presencia de microorganismos y enfermedad endodóntica, con el fin de diseñar un tratamiento racional y efectivo (Cohen y Burns, 2002).

La complejidad de una infección, depende de las propiedades de las especies microbianas infectantes, de las condiciones de los tejidos de la pulpa, y de los factores de defensa del hospedadero. Además, si los tejidos periapicales están involucrados en el proceso infeccioso, puede producirse una diseminación a distancia dentro del organismo (Negroni, 2004).

2.1.2 VÍAS DE ENTRADA DE LOS MICROORGANISMOS E INFECCIÓN DE LOS CONDUCTOS RADICULARES.

Los microorganismos pueden acceder a la pulpa dental por diferentes vías. Se debe tener en cuenta estas posibles vías durante la Operatoria Dental, Periodoncia, Prostodoncia en casos de coronas y puentes, para evitar la entrada de los mismos. Tras la obliteración del conducto radicular, hay que extremar las precauciones para evitar que los contaminantes orales, superen el sello oclusal y periférico. Los microorganismos pueden acceder a los tejidos perirradiculares a través de la obturación radicular si ésta, queda expuesta a los líquidos orales durante mucho tiempo (Weine, 1997).

Las principales vías de acceso pueden ser:

Comunicación Directa de la Cavidad Oral o la Pulpa:

La vía más evidente para la invasión de los microorganismos es a través de una cavidad

abierta, como la producida por la caries dental. El esmalte y la dentina, constituyen unas capas protectoras excelentes, estos tejidos duros, son una barrera para los microorganismos. Sin embargo, una vez que la caries daña estas capas, la protección puede disminuir rápidamente hasta que se produce la invasión a la pulpa subyacente. Las lesiones traumáticas como fracturas de corona y raíz, derivadas de traumatismos intensos, y las intervenciones operatorias, pueden suprimir la barrera dentinaria protectora y facilitar el acceso de microorganismos a la pulpa, las grietas o fisuras del esmalte a consecuencia de traumatismos continuos, atrición patológica por bruxismo, oclusión traumática, y la abrasión también facilitan el paso de las bacterias (Liébana, 2002).

Acceso a través de Túbulos Dentinarios:

Diferentes investigadores han demostrado, que los microorganismos pueden penetrar en los túbulos dentinarios y acceder a la pulpa por esa vía. Los invasores pueden entrar en los túbulos como consecuencia de la contaminación salival que se produce durante los procedimientos operatorios y a través de una lesión cariosa adyacente.

Normalmente, los microorganismos que pueden penetrar tras la preparación de una cavidad son escasos y pocos virulentos, y raras veces, produce una pulpitis clínica. La presión de los materiales de impresión, los materiales para restauración provisional, los ácidos y los cementos, pueden empujar los microorganismos desde la superficie de una preparación hasta la pulpa, a través de los túbulos.

Sin embargo, se ha comprobado que cuando una lesión cariosa hace llegar grandes cantidades de microorganismos a los túbulos próximos a la pulpa, las bacterias pueden llegar

hasta ella mucho antes que el proceso carioso, ya que las toxinas y los productos derivados del metabolismo bacteriano viajan por los tubulos dentinarios hasta llegar a la pulpa (Liébana U, 2002). A su vez las abrasiones, atriciones, erosiones cervicales, o las maniobras operatorias pueden exponer los túbulos al medio oral, posibilitando también de esta forma, la contaminación de la pulpa (Liébana, 2002). La pulpitis que se puede producir, es independiente de una posible exposición directa (Weine, 1997).

Acceso a través del Surco Gingival o del Ligamento Periodontal:

Los microorganismos y otras sustancias irritantes procedentes del ligamento periodontal, pueden acceder a la pulpa a través de los vasos del agujero apical o foramen, así como también por otros agujeros auxiliares existentes o conductos laterales (Weine, 1997), en casos de enfermedad periodontal avanzada, se destruye parte del hueso protector y tejidos blandos, y los conductos quedan expuestos a los microorganismos que se encuentran acantonados en el surco gingival y en la profundidad de las bolsas periodontales, alcanzando la proximidad del agujero apical. Estudios han sugerido, que la prevalencia y la proporción de patógenos periodontales juegan un rol importante en la patología pulpar, ya que la mayoría de los patógenos periodontales son también patógenos endodónticos, y estos tienen un potencial significativo para influir en la composición de la microbiota que infecta los canales radiculares (Siquiera Jr, 2005).

Es frecuente aislar bacterias como el *Fusobacterium nucleatum* desde infecciones periodontales; se ha sugerido que las diferentes especies pueden estar asociadas con diferentes sitios de enfermedad periodontal (Moraes, 2002).

Acceso a través de la Circulación Sanguínea o Anacoresis:

Es el mecanismo por el cual las bacterias pueden colonizar e infectar la pulpa dental a través del torrente circulatorio. No obstante, para que dicha infección se produzca, debe existir un proceso inflamatorio en el tejido pulpar, que incapacite a los mecanismos de defensa y que posibilite las condiciones necesarias para la colonización bacteriana.

Acceso a través de un Sello Oclusal Roto o de una Restauración Defectuosa en un Diente Tratado Endodóticamente:

Los estudios controlados efectuados por Torabinejad et al, han demostrado, que la contaminación salival de la zona oclusal, puede alcanzar la zona periapical en menos de seis semanas en conductos obturados con gutapercha y sellador. Si se demora el tratamiento restaurador tras el tratamiento endodóntico y se rompe el sello provisional, si la estructura dental se fractura antes de restauración final o si la restauración final es defectuosa o queda inutilizada por la caries, las bacterias pueden acceder a los tejidos periapicales y provocar infección (Torabinejad et al, 1990; citado en Weine 1997).

Investigaciones han sugerido, que el éxito endodóntico es más dependiente de la calidad de la restauración post-endodoncia que el tratamiento endodóntico por sí mismo (Trope y Ray, 1995; Wells. J, 2002; Hommez et al, 2002, 2004).

Errores en la técnica operatoria, como adaptaciones inadecuadas de los márgenes de una corona o en la línea de terminación del tallado, errores en el manejo de los materiales de obturación, la fatiga o alteración de los mismos que se produce con el paso del tiempo, puede

dar lugar a discrepancias significativas, entre el material de restauración y la estructura dentaria restaurada (Liébana. U, 2002).

Acceso a través de la Extensión de una Infección Periapical de Dientes Adyacentes Infectados:

Algunas lesiones radiolúcidas periapicales de gran tamaño, parecen abarcar las raíces de varios dientes, aunque se deban únicamente a la necrosis pulpar de un solo diente. El tratamiento endodóntico del diente causante permite eliminar toda la radiolucidez. Por supuesto, si una pulpitis o un traumatismo afectan gravemente a un diente y su vecino presenta una infección periapical, los microorganismos pueden acceder fácilmente al primero, a través de las interconexiones sanguíneas y linfáticas, por diseminación física o como consecuencia de la presión. La pulpa lesionada es invadida mediante un proceso parecido al efecto anacorético, y el foco infeccioso cercano, puede aportar un número elevado de microorganismos (Liébana. U, 2002).

2.1.3 DETERMINANTES BIOQUÍMICAS DE LA VIRULENCIA DE LA MICROBIOTA ENDODÓNTICA:

La microbiota normal, es el resultado de la colonización permanente por microbios, en una relación simbiótica que produce resultados beneficiosos. Sin embargo, en condiciones apropiadas, los componentes de la flora oral normal, se pueden convertir en "Patógenos Oportunistas". Estos, son la causa de que se desarrolle una enfermedad si acceden a zonas normalmente estériles del cuerpo, como la pulpa dental o los tejidos perirradiculares. La capacidad patógena de los microbios se conoce como virulencia (Cohen y Burns, 2002).

Los dientes comparten el microambiente de la cavidad bucal con alrededor de 500 especies bacterianas (Soares y Goldberg, 2002), todas diferentes, que colonizan la cavidad bucal humana. Estudios han sugerido que la genética y factores del medio ambiente, pueden influenciar la composición de la microbiota oral (Siqueira. Jr, 2005), parte de esa numerosa microbiota puede infectar la cámara pulpar, cuando los tejidos del diente o de soporte pierden su integridad.

El número de bacterias que colonizan la pulpa dental, será mayor según aumente el tamaño de la puerta de entrada a la infección. Este hecho, unido al factor tiempo, determinará el tipo de respuesta inflamatoria. Esta será aguda si la infección se produce por un gran número de bacterias en un tiempo corto, y por el contrario será crónica, si la puerta de entrada es pequeña, siendo por tanto el número de bacterias infectantes menor y el período de tiempo largo.

Las características morfoestructurales de la cámara pulpar y de los conductos radiculares al encontrarse las bacterias protegidas frente a los mecanismos de arrastre y frente a la acción del sistema inmunitario, debido al compromiso vascular que sufre el tejido pulpar, ofrecen condiciones ideales para la adhesión y la proliferación bacteriana.

Dentro de los factores de virulencia asociados con las bacterias, podemos incluir: cápsula bacteriana, fimbrias (pili), lipopolisacáridos (LPS), enzimas, vesículas extracelulares, ácidos grasos, poliaminas, amoníaco y sulfuros de hidrógeno.

Las fimbrias y las vesículas extracelulares, pueden participar en la agregación bacteriana y en su adherencia a los tejidos. Los pili, pueden extenderse de una bacteria a otra durante la conjugación y permitir el traspaso de ADN codificador de factores de virulencia, incluyendo la resistencia a los antibióticos. El LPS lipopolisacáridos, liberado desde la membrana externa de las bacterias Gram negativas se denomina *Endotoxina* (Cohen y Burns, 2002). La pared celular de bacterias Gram negativas contienen estas endotoxinas que poseen un potencial de acción citotóxico, que se incrementa durante la multiplicación bacteriana o durante su muerte. El LPS es responsables de muchos efectos biológicos importantes tales como; la quimiotaxis de los neutrófilos, la activación del sistema del complemento, la inducción de fiebre, alteración metabólica en muchos órganos y células, modificaciones hemodinámicas, la activación policlonal de Linfocitos B, la activación de Macrófagos, el incremento de muchos mediadores inflamatorios tales como; la activación del factor de plaquetas (PAF), factor de necrosis tumoral (TNF), Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), superóxidos (O_2^-), óxido nítrico, y prostaglandinas, como también la atracción de Osteoclastos (Oliveira et al, 2005). Algunos estudios sugieren, que las

endotoxinas, son los principales factores etiológicos involucrados en la patogénesis de la inflamación periapical, incluyendo la reabsorción ósea (Oliveira et al, 2005). La eliminación de microorganismos desde el sistema de canales, ha sido mayor luego del tratamiento endodóntico, sin embargo, después de la muerte bacteriana, las endotoxinas pueden permanecer y difundirse a través de los túbulos dentinarios. Así como también, dentro del material de obturación y filtrar hacia la región periapical (Oliveira et al, 2005).

Khabbaz et al (2001); observaron que la actividad de las endotoxinas en las muestras del canal radicular, fueron relacionadas con la presencia y el número de bacterias Gram negativas, en el canal radicular.

Oliveira y Talge (2005); Demostraron, que las endotoxinas se difunden a través de los túbulos dentinales hacia el cemento, buscando la superficie externa de la raíz después de 24 horas.

2.1.4 RESPUESTA DEL HÚESPED ANTE LA AGRESIÓN MICROBIANA.

La respuesta patógena incluye también, el daño producido por el mismo huésped cuando intenta destruir los microbios. La respuesta del huésped comprende, la inflamación inespecífica y las reacciones inmunológicas específicas (Cohen y Burns, 2002). (Fig 1). Si la microbiota, las toxinas sintetizadas por ella u otros productos derivados del metabolismo microbiano, acceden a la pulpa dental, por cualquiera de las vías expuestas anteriormente, se produce como resultado, una inflamación de la pulpa, conocida como pulpitis. Esta puede ser reversible o irreversible, aspecto que dependerá básicamente de la respuesta defensiva del hospedador, por una parte, y de la capacidad infecciosa de las bacterias, por otra.

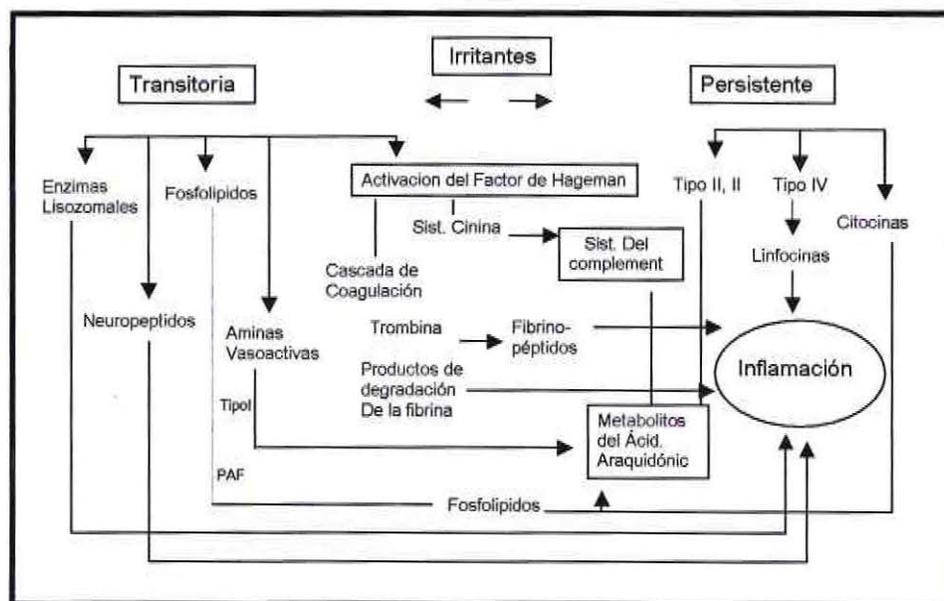


Fig.: 1 Vías de Inflamación y Reabsorción Ósea, por mediadores inflamatorios inespecíficos y reacciones inmunes. (Cohen Y Burns, 2002).

El aporte vascular del tejido pulpar, tiene lugar a través del agujero apical, que puede disminuir su dimensión como consecuencia de la aposición de dentina secundaria. Si se desarrolla una inflamación amplia, puede tener lugar una necrosis pulpar, como consecuencia del compromiso vascular derivado de la lentificación del aporte sanguíneo, ocasionado por las fuerzas de compresión de los vasos y también por la liberación de enzimas líticas, por parte de los leucocitos polimorfonucleares. Una vez que la pulpa ha claudicado, las defensas del hospedador tienen poca influencia en las posteriores interacciones microbianas que se produzcan dentro del conducto radicular.

Jontell et al, (1998); demostraron la presencia de células dendríticas en la pulpa, que activan los linfocitos T, los cuales a su vez, generan una respuesta inmune local. Hahn y cols; demostraron la producción de IgG en la pulpa, específica de las bacterias presentes en caries profundas. Si la caries o la infección del conducto radicular no se trata, la inflamación, con reabsorción ósea acompañante, se extiende a los tejidos periradiculares contiguos (Jontell et al, 1998; Hahn et al, 1998; citados en Cohen y Burns, 2002).

Los factores microbianos y del huésped, intervienen en la patogenia de las lesiones pulpares y periapicales. Al principio, la pulpa dental se infecta y luego se necrosa. El ambiente endodóntico, proporciona un hábitat selectivo para el establecimiento de una comunidad microbiana mixta, predominantemente anaerobia en el tercio apical del conducto radicular. Los productos de esa microbiota tienen propiedades biológicas tales como: antigenicidad, actividad mitogénica enzimática y activación de las células del hospedadero. Una respuesta inicial aguda en el periápice, generalmente es causada por bacterias que residen en el conducto radicular e invaden

directa o indirectamente los tejidos periapicales (Negroni, 2002). Parte de sus componentes estructurales provocan reacciones inflamatorias (Chávez. L, 2002).

Desde el punto de vista histopatológico, los cambios tisulares se caracterizan por: hiperemia, congestión vascular, edema del ligamento periodontal , extravasación de Neutrófilos, Monocitos y reabsorción ósea. Cuando existe una infección extrarradicular, se liberan mediadores tales como: neuropéptidos, péptidos fibrinolíticos, cininas, fragmentos de complemento, metabolitos del ácido araquidónico, aminos vasoactivas, enzimas lisosómicas, citocinas y mediadores de las reacciones inmunitarias. La inflamación apical y reabsorción puede resultar de necrosis e infección pulpar. La reabsorción se da por sustancias liberadas de células inflamatorias en los tejidos circundantes, tales como el factor activador del osteoclasto, factor quimiotáctico del macrófago y las prostaglandinas. Este tipo de reabsorción probablemente afecta todos los dientes que sobrellevan periodontitis apical periradicular, en casos de larga evolución puede haber áreas grandes de reabsorción de hueso periapical. Las monoquinas tales como la Interleucina 1B , es la mas activa de las citosina para estimular la reabsorción ósea, ella junto con el factor de necrosis tumoral, median un amplio espectro de efectos biológicos. El factor de necrosis tumoral alfa y el factor de necrosis tumoral beta tiene actividades de reabsorción ósea similares a la de la Il-1, sus efectos sobre los osteoclastos son indirectos y son mediados a través de los osteoblastos. El efecto del TNF alfa sobre la reabsorción ósea depende de la síntesis de prostaglandinas (Jon. Ingle, 2002).

La activación del sistema del complemento en estas lesiones contribuye a la reabsorción ósea por la destrucción del hueso ya existente o la inhibición de la formación de hueso nuevo a través de la producción de prostaglandinas que activan a los osteoclastos. En poco tiempo la moderada

reabsorción del hueso, que circunda el periápice puede ser mayor y radiográficamente se observa un área radiólucida. Además, los macrófagos activados pueden seguir produciendo una variedad de mediadores, que intensifiquen la respuesta vascular local, la reabsorción ósea osteoclástica y la degradación de las matrices extracelulares.

Las bacterias localizadas en la porción apical del canal radicular, están concebiblemente en una posición estratégica para inducir daño a los tejidos perirradiculares y ocasionar reacciones inflamatorias. La aparición de estas especies bacterianas en el tercio apical infectando los canales radiculares, sugieren que ellas pueden ser las causantes de las lesiones perirradiculares (Siqueira Jr, 2004). La porción apical del canal, puede ser territorio crítico de las bacterias patógenas, para el huésped y el clínico., debido a que en esta región ellas están en contacto cercano a los tejidos perirradiculares, de los cuales obtienen nutrientes e inducen al daño. Para el huésped, debido a que las defensas debieran concentrarse en esta área, para prevenir infecciones. Para el clínico, debido a que el éxito del tratamiento depende de su efectividad en erradicar la infección y promover al sellado de esa área (Siqueira. Jr, 2004).

La presencia continua de factores irritantes (microorganismos y sus productos), en los conductos radiculares, determina que una inflamación inicial aguda cambie gradualmente a una lesión encapsulada en tejido conectivo colágeno rico en macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que se transformarán en un granuloma. Este puede permanecer asintomático durante largo tiempo, sin mayores cambios en el estudio radiográfico. Sin embargo, el delicado equilibrio en el periápice, puede romperse en cualquier momento. Las bacterias pueden avanzar hacia el tejido periapical y estimular una serie de factores que juegan un rol importante en la patogénesis,

de la enfermedad perirradicular (Rocas, 2004). El granuloma crónico, puede transformarse en agudo, con manifestaciones clínicas, como resultado pueden encontrarse microorganismos intracelulares y extracelulares durante estos episodios agudos. Esta exacerbación puede ocasionar una rápida reabsorción ósea y un aumento del área radiólucida. La progresión del proceso inflamatorio crónico y agudo es discontinua, con períodos de exacerbación, luego de períodos de estabilidad o remisión.

2.1.5 CAUSAS MICROBIANAS DE LA INFLAMACIÓN ENDODÓNTICA.

Los factores causantes de la inflamación endodóntica, incluyen: factores mecánicos, químicos y/o injuria microbial de la pulpa o tejido perirradicular (Seltzer y Naidorf 1985; Torabinejad et al, 1988; citado en Siqueira 2003b). De estos factores, los microorganismos, son indiscutiblemente los mayores agentes causantes de inflamación, incluso, aunque el huésped es usualmente incapaz de eliminar la infección del conducto radicular, la movilización y adicional concentración de componentes de defensa del tejido perirradicular, impiden la extensión de la infección. De este modo un balance entre la agresión microbiana y defensas del huésped es comúnmente logrado. Hay algunas situaciones durante la terapia endodóntica, en el cual se puede interrumpir tal equilibrio en favor de la agresión microbiana, y una inflamación aguda perirradicular puede suceder.

El compromiso inflamatorio es una verdadera complicación, caracterizada por el desarrollo del dolor, tumefacción, o ambas. La respuesta inflamatoria, es directamente proporcional a la intensidad de la injuria tisular. Siguiendo la injuria al tejido perirradicular, innumerables sustancias químicas son puestas en circulación o activadas, las cuales mediarán eventos característicos de la inflamación tales como; vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular y quimiotaxis de células inflamatorias. Los mediadores químicos, de la inflamación incluyen; aminas vasoactivas, prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas, neuropéptidos, enzimas lisosomales, óxido nítrico, radicales libres derivados de oxígeno y factores derivados del plasma (sistemas del complemento, quininas y coagulación). La síntesis y/o puesta en circulación de

prácticamente todos estos mediadores, ocurren en lesiones perirradiculares. Aunque algunos mediadores, pueden causar dolor a través de la estimulación directa de las fibras sensoriales nerviosas, el mayor evento inflamatorio responsable del dolor perirradicular al parecer, es el aumento en la permeabilidad vascular, ocasionando formación de edema. Estos fenómenos, inducen a un aumento en la presión hidrostática del tejido, con la compresión consiguiente de los terminales nerviosos y generación del dolor, siempre que la presión sea suficientemente alta, para alcanzar el umbral de la excitabilidad de las fibras nerviosas periodontales (Walton, 1992).

Bacterias como el *F. nucleatum*, están asociadas con el desarrollo de formas más severas de dolor postoperatorio entre consultas o reagudizaciones endodónticas (Chávez, 2002). Una inflamación de origen infeccioso, puede ocurrir a veces, aunque los procedimientos en el conducto han sido realizados juiciosamente y cuidadosamente (Chávez, 2002).

Muchas evidencias indican, que los desórdenes inflamatorios perirradiculares, son enfermedades infecciosas, causadas por los microorganismos en el sistema de conductos. Las condiciones ambientales dentro del sistema de conductos que contiene pulpa necrótica, son importantes para el establecimiento de diversas especies bacterianas orales, particularmente, bacterias anaeróbicas estrictas, con demanda de requerimientos alimenticios. Han sugerido los estudios, que la presencia de ciertas especies bacterianas están asociadas, a características clínicas y a enfermedades perirradiculares.

Algunas bacterias anaerobias Gram negativas, fueron asociadas con la etiología de lesiones perirradiculares sintomáticas (Siqueira 2002). Sin embargo, los estudios han revelado que ciertas

especies comúnmente asociadas con síntomas, se pueden también observar con frecuencia en casos asintomáticos. Se ha argumentado, que todos los clones de una especie patógena no son igualmente virulentos (Ozmeri et al, 2002). El hecho de que la cepa del patógeno endodóntico, tienen diferencias en la virulencia puede ser una de las explicaciones del porque algunas especies se encuentran en casos sintomáticos y asintomáticos. Así, se puede conjeturar que las cepas de una especie microbiana dada, presentes en los casos sintomáticos son clones más virulentos que esos encontrado en casos asintomáticos.

La presencia de otra especie en una comunidad mixta que actúe en forma sinérgicas o en interacción aditiva, puede influenciar la virulencia de una bacteria, así como la mayoría de los patógenos endodónticos putativos, estos solamente muestran virulencia, o son más virulentos cuando están en cultivos mixtos.

El patógeno, debe alcanzar suficientes números para iniciar y/o mantener una enfermedad (carga microbiana). Así, la diferencia en número puede también explicar por qué ciertas especies se encuentran en casos sintomáticos y asintomáticos. Es posible que la cepa de una especie dada esté en números más altos en casos sintomáticos que en los asintomáticos.

Las cepas virulentas de especies patógenas no siempre expresan sus factores de virulencia. La evidencia reciente indica que las bacterias pueden cambiar su comportamiento, y por lo tanto llegar a ser virulentas o aún más virulentas, debido a las tensiones ambientales generadas por condiciones tales como: densidad poblacional, Ph, temperatura, disponibilidad de hierro, etc.

La diferencia en la susceptibilidad del huésped por varios agentes infecciosos, ha sido reconocida por varios años, y las enfermedades perirradiculares son influenciadas ciertamente por este factor. Hipotéticamente, los sujetos que han reducido su capacidad de hacer frente a infecciones, pueden ser más propensos a presentar los síntomas clínicos asociados a infecciones endodónticas.

Los microorganismos, son los principales agentes causantes de la inflamación perirradicular. Los cambios en la microbiota endodóntica o las condiciones ambientales, propician este efecto (Siqueira et al, 2002b). La microbiota endodóntica, se establece generalmente como un consorcio mezclado, y la alteración de parte de este consorcio afectará el ambiente y las especies restantes.

La organización de micro-colonias en la comunidad endodóntica, se rige por los determinantes ecológicos que ocurren en diversas partes del sistema del conducto. Por ejemplo, como ambos la tensión de oxígeno y el potencial de óxido reducción de la porción oral del conducto, son probablemente más altos que en otras porciones, los facultativos y los aeróbios aero-tolerantes pueden predominar en tal región. Por otra parte, la proporción de anaerobios es perceptiblemente más alta en el tercio apical del conducto, particularmente debido a las condiciones anaeróbicas del ambiente. Esto adquiere importancia ecológica ya que permite el establecimiento y la supervivencia de especies determinadas, en el sistema de conductos (Siqueira 2005). Las interacciones positivas y negativas entre los miembros de la comunidad microbiana permiten, que la comunidad esté relativamente estable y en equilibrio. Las fuerzas exógenas, representadas por la preparación químico-mecánica, usando irrigantes antimicrobiales y medicación intra-conducto, son necesarias para eliminar a tales comunidades. La incompleta preparación químico-mecánica,

puede interrumpir el equilibrio dentro de la comunidad microbiana, eliminando algunas de las especies inhibitorias y dejando de lado a otras especies previamente inhibidas, las cuales pueden entonces crecer demasiado. Si las cepas con sobrecrecimiento son virulentas y/o alcanzan números suficientes, los cambios a los tejidos periapicales y radiculares pueden ser intensificados, y éste puede resultar en la exacerbación de la lesión.

Cuando los organismos no se eliminan totalmente del sistema de conductos, los cambios ambientales tienen el potencial de inducir la activación o desactivación en la virulencia de los genes. Es probable que esto siga aún más pronunciado en casos de instrumentación incompleta del conducto. Diferencias e imprescindibles consecuencias, pueden seguir induciendo cambios ambientales en el conducto. Por ejemplo, cuando los cambios ambientales inducen la desactivación de la virulencia de los genes, la remisión en los síntomas de casos previamente sintomáticos podría sobrevenir o aún dar lugar al éxito del tratamiento endodóntico, incluso en las situaciones donde los microorganismos no se suprimen totalmente del canal de la raíz. Por otra parte, cuando los cambios ambientales enciendan la virulencia de los genes, en casos previamente asintomáticos, puede llegar a ser sintomático o una infección persistente puede establecerse en el sistema de conductos (Siqueira, Jr, 2003b).

2.2 TECNICAS DE MEDICION E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

2.2.1 STATUS BACTERIOLÓGICO DEL CONDUCTO RADICULAR CON LESIONES PERIRRADICULARES.

La causa más común de la enfermedad pulpar, son los microorganismos provenientes de la caries dental. Si la necrosis pulpar ocurre por razones no microbianas, tarde o temprano es probable que se establezca una infección por microorganismos orales (Siqueira Jr et al, 2002).

La infección de la pulpa necrótica, se puede producir a través de las mismas vías que en una pulpa vital, pero a diferencia de estos casos, en la pulpa necrótica la evolución es incontrolable. La infección se produce fácilmente debido a que los mecanismos de defensa son incompetentes. El tejido pulpar puede mantenerse inflamado por largos períodos de tiempo, y puede convertirse en necrótico lentamente o llegar a ser necrótico rápidamente. Este evento depende de varios factores: a) virulencia de las bacterias; b) la capacidad de secretar fluidos inflamatorios para disminuir el incremento en la presión intrapulpar; c) resistencia del huésped d) cantidad de circulación y más importante aún; e) drenaje linfático (Walton, 1992).

Debido a la pérdida de circulación dentro de la pulpa necrótica, los mecanismos de defensa del huésped (inflamación e inmunidad), están ausentes o comprometidos, la cavidad pulpar se convierte en un reservorio para microbios invasores. El sistema del conducto radicular se convierte en un ambiente especial para un grupo específico de bacterias.

El fluido tisular y las células desintegradas del tejido necrótico, forman un sustrato de nutrientes (especialmente polipéptidos y aminoácidos), esenciales para los microorganismos. Estos nutrientes, la tensión baja de oxígeno y las interacciones bacterianas, son la llave ecológica que determina qué bacterias predominarán. Estas condiciones favorecen, el crecimiento de anaerobios capaces de metabolizar péptidos y aminoácidos más que carbohidratos. El crecimiento de una especie bacteriana dependerá de otras especies comensales que proveen nutrientes esenciales como bioproductos metabólicos. En los humanos, cuando las bacterias alcanzan la pulpa, esta se inflama pero permanece vital por algún tiempo, o se vuelve necrótica rápidamente. Los microorganismos invaden la pulpa necrótica, la colonizan, se multiplican e infectan el sistema de conductos radiculares, incluyendo los tubulillos dentinales.

Estudios con métodos de cultivo han indicado, que solo un subconjunto en la microflora bacteriana son los responsable por las infecciones endodónticas, los métodos moleculares han revelado todo lo contrario, que una microflora muy diversa, esta asociada con las infecciones endodónticas, estos incluyen géneros bacterianos como: *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, y *Lactobacillus* (Munson et al, 2002). Por lo tanto, es probable que organismos no cultivables estén presentes en infecciones endodónticas y que puedan jugar un rol importante en la patogénesis de las lesiones (Munson et al, 2002).

Con la introducción de los métodos moleculares, el análisis de las muestras desde el canal radicular, ha conducido a la identificación de un número grande de organismos como: *Bacteroides forsythus*, y *Treponema denticola*, los cuales no habían sido previamente descritos en

infecciones endodónticas. Las pruebas moleculares, son más sensitivas y eficientes que los métodos de cultivo e identificación bioquímica, en infecciones endodónticas (Foad et al, 2002).

Mientras las investigaciones sobre enfermedades periodontales pueden distinguir patógenos dentro de una microbiota normal en infecciones endodónticas, este problema no existe, debido a que los sistema de canales no poseen una microbiota normal. Mientras la pulpa está vital éste es un tejido estéril, como cualquier tejido conectivo de cualquier otra parte del cuerpo. La infección ocurre sólo luego de la necrosis pulpar. Una vez que se presenta, solo unas restringidas especies pueden colonizarla. Algunos grupos de especies microbianas han sido reportados por estar asociados con formas particulares de enfermedad perirradicular, los cuales le confieren una etiología semi-especifica para infecciones endodónticas, en general las especies frecuentemente aisladas en infecciones primarias encontramos; *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponemas*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, y *Streptococcus* (Siqueira. Jr. et al, 2002a). Teóricamente cualquier especie de microbios que colonice la pulpa necrótica, podría participar en la patogénesis de la enfermedad perirradicular. Sin embargo, parece que no todas las especies presentes en las infecciones endodónticas, son capaces de causar enfermedad. La evidencia actual sugiere que sólo un grupo de especies microbianas, es más prevalente en las diferentes formas de enfermedad perirradicular. Esta asociación sugiere un rol patogénico (Siqueira et al, 2002a).

El contenido de un conducto radicular infectado es un potente irritante. Una lesión perirradicular se desarrolla cuando el conducto radicular contiene bacterias como consecuencia, de la exposición a la cavidad oral o por caries dental, La pulpa aparentemente, no es capaz de eliminar estas bacterias dañinas y se convierte en un albergue de bacterias y sus bioproductos, las

defensas temporalmente detienen o retrasan la diseminación de la infección y la destrucción de los tejidos. Tarde o temprano el daño llegará a ser más extenso y dispersarse por toda la pulpa, luego las bacterias o bioproductos bacterianos y otros irritantes del tejido necrótico se difundirán por el conducto radicular al periápice, resultando en el desarrollo de lesiones inflamatorias (Siqueira et al, 2002a). Estudios en animales han mostrado, que existe un cambio en la microbiota del canal radicular de predominantemente facultativo durante los primeros días, hasta un aumento significativo de Gram-negativos y anaeróbicos después de un corto período de tiempo (semanas a meses). Estos cambios fueron reportados que ocurrían durante el período de expansión rápida de la lesión. Conclusiones de estos estudios han indicado que un grupo restringido de especies está implicado en la patogénesis de las lesiones perirradiculares (Siqueira et al, 2002b).

Hay evidencias que indican, que los bioproductos bacterianos emanados del conducto radicular, son los mayores irritantes asociados con periodontitis apical. Aunque algunos factores químicos y físicos pueden inducir inflamación perirradicular, muchas evidencias indican que los agentes microbianos son esenciales para la progresión y propagación del proceso inflamatorio perirradicular (Siqueira et al, 2002a). El canal radicular infectado, constituye la primera fuente de irritación microbiana a los tejidos perirradiculares. Los microorganismos están localizados en posiciones privilegiadas y estratégicas, dentro del canal radicular que contiene tejido pulpar necrótico. En esas posiciones, ellos están protegidos de la acción de las células de defensa. Por otra Parte, la microbiota localizada en la porción apical del canal radicular, usualmente se encuentra delineada de los tejidos perirradiculares inflamados, por una densa acumulación de neutrófilos polimorfonucleares o por plugs epiteliales cerca del foramen apical. Generalmente un

equilibrio entre la agresión y defensa es generalmente obtenido, lo que resulta en un desarrollo de la inflamación crónica de los tejidos que rodean las zonas de escape de las bacterias. Si la infección endodóntica, es efectivamente erradicada durante el tratamiento endodóntico, el huésped es favorecido y la reparación de los tejidos es lograda (Siqueira Jr, 2002).

Los bioproductos bacterianos por sí solos, son capaces de causar patosis perirradicular. Los microorganismos desde el canal radicular pueden invadir lesiones periapicales endodónticas establecer enfermedades infecciosas y procesos extraradiculares (Sunde. P. et al, 2002).

Eventualmente, la patogénesis perirradicular se produce en respuesta a microorganismos, bioproductos microbianos y productos de desecho microbianos. La extensión de la reacción inflamatoria perirradicular, dependerá de la severidad de la irritación, duración y respuesta del huésped (Siqueira .Jr, 2002)

Siqueira y Rocas, (2004); consideraron que las bacterias localizadas en la porción apical en conductos con necrosis y lesión periapical, se encuentran concebiblemente en una posición estratégica para inducir daño a los tejidos y ellas pueden estar involucradas en las causas de las lesiones periapicales (Siqueira, 2005). Entre las bacterias encontradas en estos conductos figuran: *Pseudoramibacter Alactolyticus*, *Treponema denticola*, *F. nucleatum*, *Porphyromona endodontalis*, *Filifactor alocis* (anteriormente llamado *fusobacterium alocis*) (Siqueira et al, 2003). *Dialister pneumosintes*, *Porphyromona gingivalis*, *Tannarella forsythensis*.

La periodontitis apical aguda, es la respuesta inicial que resulta de la extensión de la inflamación periapical al ápice. Bacterias y sus bioproductos están usualmente involucrados en estos procesos. Otros factores que están relacionados con la periodontitis apical aguda son: los mediadores inflamatorios de la pulpa, el trauma al instrumentar y los químicos utilizados durante el tratamiento de los conductos radiculares.

Una de las bacterias encontradas comúnmente como parte de la microflora del canal en infecciones primarias, es el *Fusobacterium Sp*, esta es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, de forma no esporulada, no móvil, normalmente aislada desde la cavidad oral. El *Fusobacterium*, ha sido diferenciado dentro de cinco subespecies: *nucleatum*, *plymorphum*, *vicentii*, *fusiforme*, *animalis*, y otras de origen animal (Moraes et al, 2002). Posee como parte de los componentes estructurales de la pared celular (lipopolisacáridos), importantes endotoxinas capaces de provocar reacciones inflamatorias graves (Chávez, 2002; Oliveira, 2005).

Esta bacteria, también es frecuente aislarla en el periodonto. Estudios sugieren, un rol patogénico de esta especie con las diferentes formas de enfermedad periodontal (Moraes, 2002).

Otra de las especies encontradas en infecciones de los conductos radiculares y conocido por su poder agresivo es, el *Enterococcus Sp*, esta bacteria es un coco Gram positivos, de forma no esporulada, fermentativo, anaerobio facultativo (Siqueira y rocas 2002., Rocas. I. 2004). Es una bacteria oral común, comensal, adaptada al complejo medio ambiente de la cavidad oral, gastrointestinal y tracto vaginal. Es conocido por ser una importante causa de infecciones oportunistas y tener una fuerte habilidad, para resistir a muchos antibióticos y desinfectantes y al

tratamiento endodóntico (Hancock et al, 2001; Siqueira y Rocas 2002). Muchos estudios han reportado, que el *Enterococcus*, es una de las bacterias que son difíciles de remover desde el canal radicular en los tratamientos endodónticos (Chávez, 2002).

Especies pertenecientes al género *Enterococcus*, pueden ser halladas en diversos ambientes tales como: en el tracto gastrointestinal de humanos, en otros mamíferos, pájaros, reptiles, insectos, plantas, agua, y suelo. Ellos son también capaces de colonizar el tracto genitourinario y la cavidad oral. De las especies de *Enterococcus*, el *faecalis*, es la más comúnmente aislada o detectada en infecciones orales, incluyendo en la periodontitis marginal, infección de los canales radiculares y abscesos periradiculares (Rocas. I, 2004).

Tradicionalmente la identificación del *Enterococcus* en diversos sitios, ha sido desarrollada por procedimientos de cultivo, de hecho la detección de la bacteria en infecciones primarias endodónticas y en infecciones persistentes, ha sido casi exclusivamente por estudios usando medios de cultivo. Sin embargo, debido al tiempo que consume la técnica, y la baja sensibilidad de diagnóstico, una alternativa para la identificación ha sido propuesta, muchos ensayos moleculares han sido utilizados, estos ensayos incluyen, el método de la Reacción en cadena de polimerasa (PCR). Recientemente el acceso a la genética molecular, se ha utilizado para la identificación de esta bacteria, en infecciones de origen endodóntico (Rocas. I, 2004).

2.2.2 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Tradicionalmente la identificación bacteriana en infecciones endodónticas, han sido realizadas mediante los métodos de cultivo. Sin embargo, tal como en otras áreas de la microbiología clínica, investigaciones basadas en estos métodos, son significativamente problemáticas, incluyendo el hecho de la existencia de microorganismos viables pero no cultivables, capaces de causar enfermedades, además de una inadecuada identificación. Numerosas técnicas moleculares, han sido usadas para el diagnóstico de microorganismos, pero solo recientemente algunas de estas técnicas, han sido aplicadas, para la investigación en la microbiología endodóntica (Siqueira 2005a). Por más de un siglo, los cultivos usando medios de crecimiento, han sido los métodos estándar para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, pero estos han mostrado muchas limitaciones y desventajas en relación con los avances de la genética molecular (Siqueira, 2002b). Ciertamente aún existen bacterias imposibles de cultivar, además estas pruebas suelen ser costosas, ellas pueden tardar muchos días, hasta semanas, para identificar las bacterias anaerobias (eso puede retardar el tratamiento antimicrobiano), consumen mucho tiempo, tienen baja sensibilidad (particularmente en bacterias anaerobias), su especificidad puede ser baja, tienen una estricta dependencia del modo de transportación de la muestra; y finalmente, la imposibilidad de cultivar un amplio número de especies microbianas.

Por otra parte, a nivel de Microscopía, ésta puede sugerir un agente etiológico, pero raramente suministra evidencia definitiva de la infección por una especie particular (Siqueira 2005a). Muchas dificultades pueden ser usualmente observadas, cuando se evalúan infecciones mixtas,

tales como las de los conductos radiculares. Durante la última década, los métodos de genética molecular han sido utilizados para la identificación de bacterias en muestras clínicas, sin la necesidad de medios de cultivo. Los métodos moleculares, permiten la detección de microorganismos que son dificultosos o imposibles para desarrollarse en medios de cultivo (Foaud et al, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), método que ha sido recientemente utilizado para identificar una variedad de microorganismos (incluyendo bacterias anaeróbicas), permite la detección simultánea de muchas especies bacterianas, en una única o en múltiples muestras. Resultados de estudios sugieren, que los componentes de la pulpa necrótica no inhiben significativamente la reacción de amplificación (Machado. J, 2000). En adición, PCR puede detectar células bacterianas muertas o no cultivables. Las pruebas basadas en PCR, podrían ser desarrolladas para la detección cuantitativa en situ. Pocos estudios han usado PCR para investigar la microbiota en canales radiculares infectados (Moraes, 2002), (Bortoluci. F y De Sousa, 2002).

En los años setenta, se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y relativamente rápida determinar la secuencia nucleotídica de cualquier fragmento de ADN. Estos primeros intentos de secuenciar los ácidos nucleicos, siguieron los pasos empleados en la secuenciación de proteínas, que consiste en romper las moléculas en pequeños fragmentos, determinar su composición de bases y deducir la secuencia a partir de fragmentos solapantes.

2.2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

En Abril de 1985, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, en el laboratorio de Cetus Corporation, California-USA, lo que le representó el premio Nobel en 1993. Esta es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN, con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular, ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN.

Su nombre lo debe a que la actividad de la enzima ADN polimerasa, permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. La técnica permite la copia in Vitro de fragmentos específicos de ADN; consiste en la separación por calor de las dos cadenas del ADN que se quiere amplificar a partir de un punto marcado por dos segmentos pequeños de ADN, conocidos como cebadores (primers o iniciadores), que están constituidos de 10 a 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar. Mediante la acción de una enzima denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios, para obtener una replica exacta de la cadena original. Este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido.

Sus únicos requerimientos son, que existan nucleótidos en el medio (adenina, guanina, citosina y timina), cebadores, ADN original y la enzima ADN polimerasa. Debido, a que, en el desarrollo de la técnica se emplean temperaturas mayores de 70°, se requiere de una enzima que no se inactive a temperaturas elevadas, por lo que se utiliza la ADN polimerasa de la bacteria *thermus aquaticus*, que vive en aguas termales y cuya enzima puede trabajar a altas temperaturas (Larrick JW, 1997), (Baltimore. L, 1997).

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa, en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena.

2ª Hibridación de los iniciadores.

3ª Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización), la doble hélice de ADN, se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra, a altas temperaturas que pueden ser próximas a ebullición (93-97 °C). Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

En el segundo paso (hibridación), se baja la temperatura (50-65° C) para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

En la tercera etapa (elongación), se produce la síntesis de una cadena sencilla, produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad, mediante la enzima ADN polimerasa (Costa. J, 2005). Todos estos pasos se pueden apreciar gráficamente en la (Fig. 1).

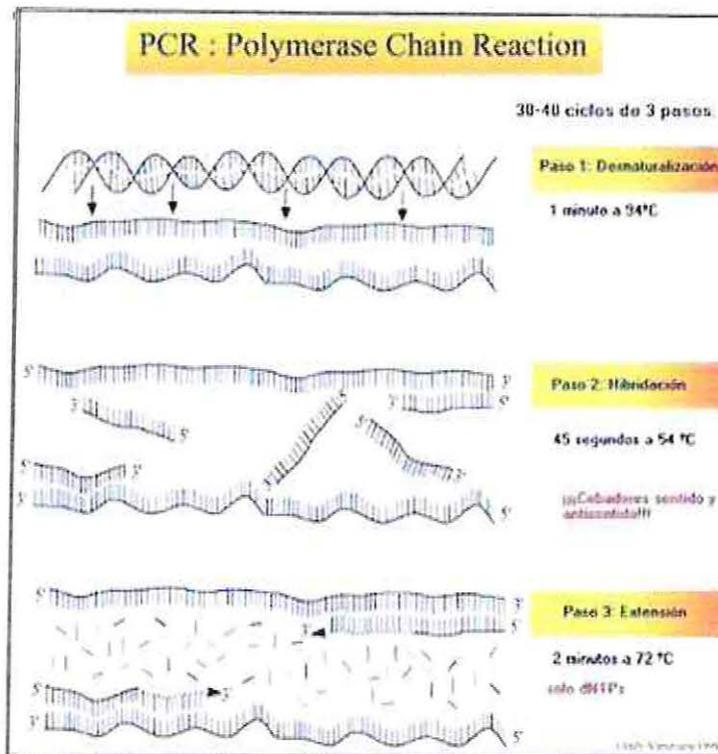


Figura 1: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999)

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador (fig.2). Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.



Figura 2: Termociclador para reacciones de PCR.

Se observa en la figura 3, que una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4 y al final del tercero 8, (así sucesivamente). Si los ciclos se producen en número "n" de veces y suponiendo que el número de copias del ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

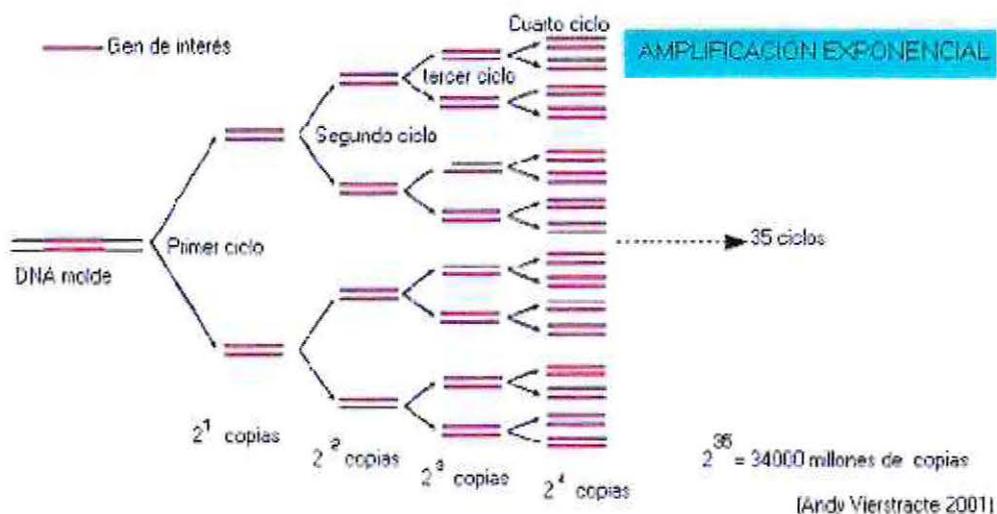


Figura 3: Amplificación exponencial del PCR (de Andy Vierstracte 2001).

La detección del producto, de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se realiza normalmente mediante un corrido electroforético (Fig. 4), dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que se desee, se utilizaran diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio, se observa con (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia, radioactividad.



Figura 4: Preparación del corrido electroforético

El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que sirvió como molde.

Una ventaja de la técnica, es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que se desea, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad).

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que se quiere amplificar.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA), que reducen la concentración de iones de Mg. en la disolución. Tampoco debe

haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes, que inhibirían la actividad de la polimerasa.

- Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico de copia única, se usan cantidades de 100-500 ng. En el caso de zonas repetidas se puede reducir esta cantidad a 10-50 ng. El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng (Larrick JW, 1997).

2.2.4 ADN Polimerasa

Existen diferentes tipos de ADN polimerasa, que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

Termolábiles: T^o óptima de 37-42 °C. Se desnaturalizan con el calor.

Termoestables: T^o óptima de 74 °C. Resiste durante 40-50'a 96 °C.

Inicialmente se usó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. Coli*, que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado. La importancia de esta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del ADN original. Sin embargo, se trata de una enzima termolábil, por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizadas en una PCR.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa. La cual es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La utilización de la Taq polimerasa, ha simplificado enormemente la técnica PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador) (Costa. J 2005), (Larrick JW, 1997).

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:

- **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la presencia de las diferentes bacterias en el sistema de conductos radiculares en dientes con diagnóstico de necrosis pulpar y lesión periapical utilizando la Técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa o PCR.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar la frecuencia del *Enterococcus Sp*, en los conductos con necrosis pulpar y lesión periapical.
2. Determinar la frecuencia del *Fusobacterium Sp*, en los conductos con necrosis pulpar y lesión periapical.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Material.

a. Universo:

50 Pacientes que habían sido referidos para tratamiento endodóntico, en la Universidad de Valparaíso, Facultad de Odontología Departamento de Endodoncia en Valparaíso, Chile.

b. Muestra:

Las muestras seleccionadas fueron 27 conductos de dientes anteriores y posteriores (conductos palatinos , mesiales de superiores y dístales de inferiores) en pacientes adultos, con un rango de edad comprendidos entre los 18 a 81 años. Fueron incluidos en este estudio aquellos casos de dientes con ápices cerrados, caries profundas, pulpa necrótica, y con evidencia radiográfica de pérdida ósea por enfermedad perirradicular. Se excluyeron aquellos que tenían menos de 3 meses de haber recibido tratamiento con antibióticos. Los pacientes fueron seleccionados a medida que iban llegando a la consulta del área clínica, mediante un muestreo sistemático, eligiendo 1 de cada 2 pacientes, hasta completar el tamaño de la muestra.

2. Métodos de Recolección de la información.

a. Técnica:

En cada caso, el diente y la mucosa oral fueron limpiados y desinfectados con Gluconato de Clorhexidina al 2%. Posteriormente se anestesió al paciente. Luego se aisló de manera absoluta, con Goma Dique y Clamps, y se limpió el campo operatorio con Peroxido de hidrogeno al 3%, mientras que se descontaminó con solución de Hipoclorito de sodio al 2.5% (NaOCL). Completada la preparación de acceso, el cual se realizó usando fresas estériles redondas de Carburo y refrigeración estéril, el campo operatorio (incluyendo la corona en su porción externa), se desinfectaron con Hipoclorito de sodio al 2,5%, el cual ha demostrado ser significativamente más efectivo en la descontaminación del campo operatorio, durante la detección bacteriana de muestras con PCR (Yuan-Ling, 2003).

Se aplicó la técnica de Crown Down, con el uso de fresas Gates-Glidden (Fig. 1) No. 1, 2 y 3, con una secuencia adaptada a cada caso, utilizadas hasta el tercio medio del conducto, para acceder de manera directa al tercio apical sin interferencias, utilizando como irrigante suero fisiológico, debido a que el uso de cualquier tipo de antiséptico podría alterar la muestra. Posteriormente, se introdujo en el conducto radicular, una pequeña cantidad de suero fisiológico. La muestra fue inicialmente recolectada con una punta de papel estéril, la cual fue llevada con un pinza al conducto radicular (Fig. 2), hasta un límite cercano a la contricción apical, con el objeto de absorber los fluidos presentes dentro del canal, dicha punta se retuvo en el conducto durante 1 minuto. Esta fue retirada y colocada dentro del tubo de ensayo estéril (Fig. 3a). Luego, fue

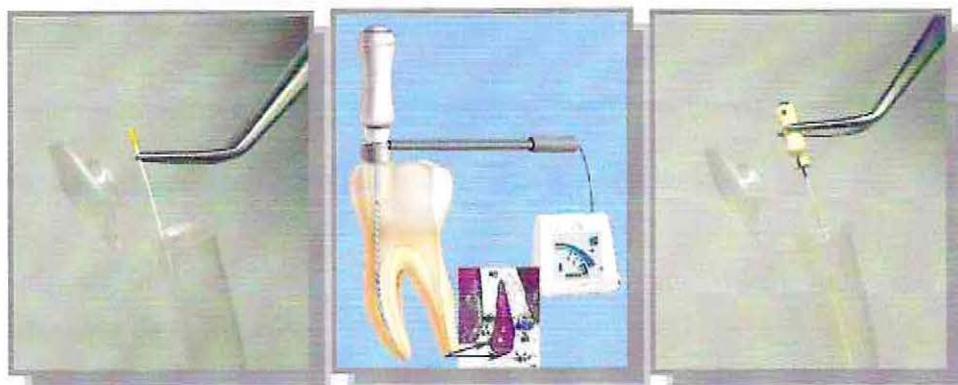
llevada dentro del conducto con la ayuda de un localizador apical (Root ZX) (Fig. 3b), una lima tipo K # 15 Kerr, a un limite cercano a la contricción apical (-1mm corto de la longitud de trabajo) y se le aplicó un discreto movimiento rotacional. Pasado un minuto, se retiró la lima y se colocó junto con la punta de papel, dentro del tubo (Fig. 3c y 4a). Posteriormente cada tubo eppendorf (que contenía el instrumento y la punta de papel), fue colocado en refrigeración a una temperatura aprox. de -5 grados bajo cero. Finalmente se colocaron las muestras en un contenedor para mantener su temperatura, mientras se transportaban al laboratorio en un tiempo (de 2 horas aprox.)



Fig. 1. Fresas Gates Glidden



Fig. 2. Punta de papel llevada al conducto



Figuras 3a, 3b y 3c. a. Punta de Papel llevada al tubo Eppendorf. b. Localizador apical utilizado para llegar a 1 mm. De la constricción apical. c. Lima tipo K no.15 llevada al tubo.



Figuras 4a, 4b. a. Lima y punta de papel dentro del tubo. b. Paquete listo para ser enviado al laboratorio.

El método de PCR fue la técnica utilizada para la detección de las bacterias, *Enterococcus Sp* y *Fusobacterium Sp*. El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio, utilizando un termociclador para la amplificación del ADN bacteriano encontrado en las muestras. El producto se depositó en un gel de agarosa donde se realizó la electroforesis; luego el mismo gel se colocó sobre un transluminador de luz ultravioleta para visualizar los fragmentos amplificados,

contraponiéndolos con los segmentos de ADN esperados. En caso de corresponder, se informa la existencia de dicha bacteria en la muestra.

Los resultados obtenidos en este procedimiento, fueron recibidos a las 72 horas del envío, procediéndose a la tabulación y la aplicación del análisis estadístico.

b. Estandarización de la Técnica:

El protocolo para la recolección de muestras en la detección bacteriana con el método PCR, ha sido establecido en investigaciones realizadas anteriormente. Todos los casos presentados en este estudio fueron tomados respetando las normas preestablecidas, siguiendo en todo momento las pautas de desinfección y asepsia durante cada uno de los procedimientos.

5. RESULTADOS.

Recolección de datos: Los datos obtenidos en el laboratorio fueron arrojados en el siguiente listado. Los datos muestran la presencia o ausencia de las bacterias y las respectivas señales obtenidas, en cada uno de los 27 conductos.

Descripción de datos de las variables seleccionadas.

	Fusobacterium Sp	Señal	Enterococos Sp	Señal
1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
3	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
6	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
7	Positiva	Débil	Negativa	Negativa
8	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
10	Positiva	Débil	Negativa	Negativa
11	Positiva	Intermedia	Negativa	Negativa
12	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
13	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
14	Positiva	Débil	Negativa	Negativa
15	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
16	Positiva	Fuerte	Negativa	Negativa
17	Positiva	Intermedia	Negativa	Negativa
18	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
19	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
20	Positiva	Fuerte	Negativa	Negativa
21	Positiva	Intermedia	Negativa	Negativa
22	Positiva	Fuerte	Negativa	Negativa
23	Positiva	Débil	Negativa	Negativa
24	Positiva	Intermedia	Negativa	Negativa
25	Positiva	Fuerte	Negativa	Negativa
26	Positiva	Débil	Negativa	Negativa
27	Positiva	Fuerte	Negativa	Negativa

Las señales obtenidas en los conductos por las bacterias, fueron las siguientes, entendiéndose que éstas están estandarizadas como señal débil (500 - 5.000 bacterias), señal intermedia (5.000 - 50.000 bacterias), señal fuerte (50.000 - 500.000 bacterias) y señal muy fuerte (mayor que 500.000 bacterias).

Tabla # I. Frecuencia de la especie de *Fusobacterium Sp.* y *Enterococcus Sp.* en los 27 conductos estudiados.

Fusobacterium Sp.			Enterococcus Sp.		
Categoría	Nº	%	Categoría	Nº	%
Negativa	13	48,15	Negativa	27	100
Positiva	14	51,85	Positiva	0	0

Nótese que la presencia negativa del *Fusobacterium* fue de un 48% y del *Enterococcus* un 100% en las 27 muestras obtenidas.

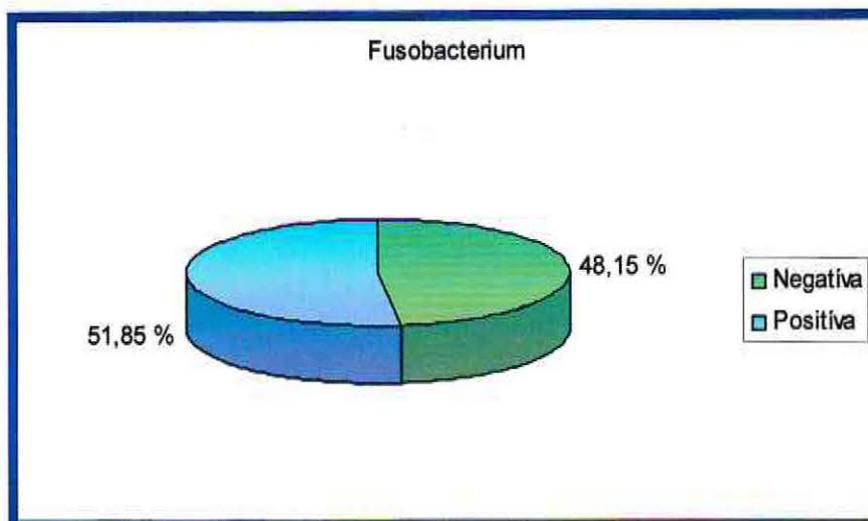
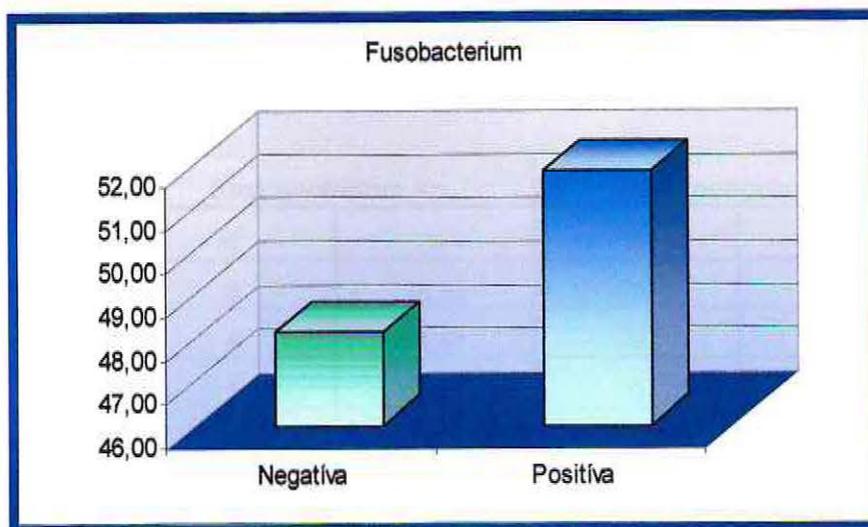
Cálculo del Intervalo de Confianza.

$$IC(p) = P \pm 1,96 \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

$$IC = 0,5185 \pm 1,96 \sqrt{\frac{0,5185(1-0,5185)}{27}} \quad IC = 0,1885$$

Tabla # II: Proporción e intervalos de confianza.

	IC+	IC-	Proporción
Fusobacterium	0,7070	0,3300	0,5185



Gráficos 1 y 2: Frecuencia del *Fusobacterium Sp* en los 27 conductos.

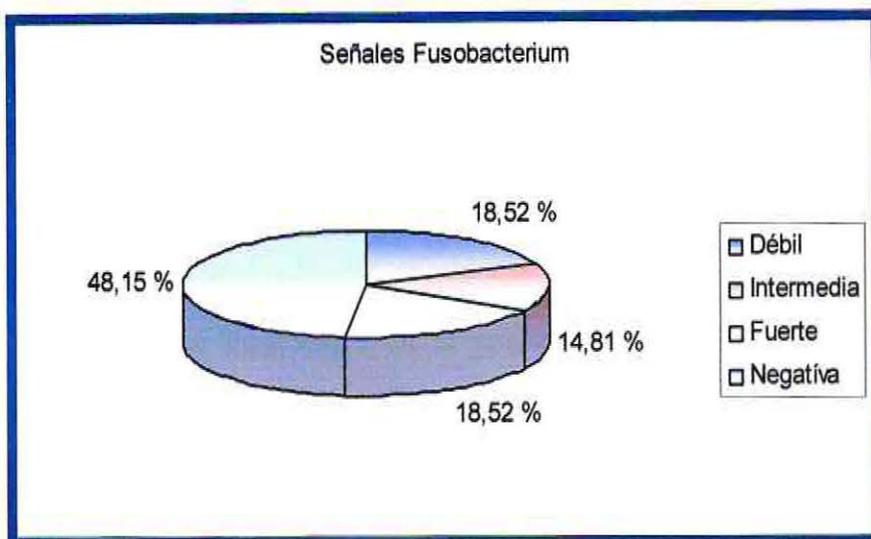
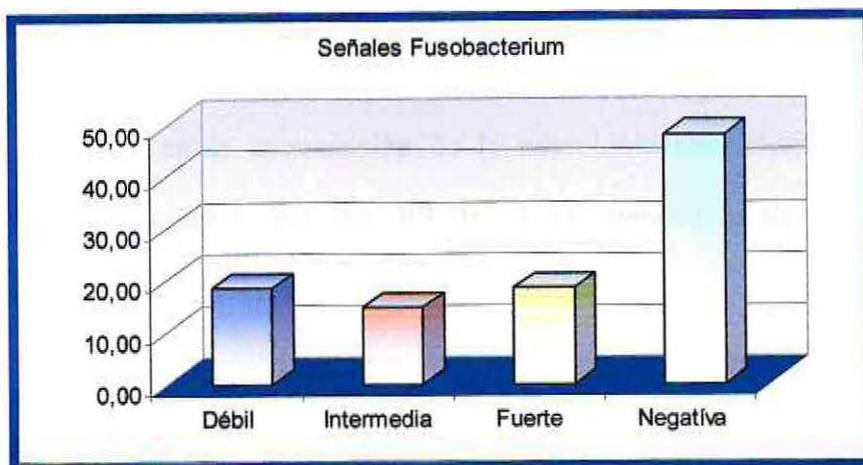
En los gráficos que a continuación se presentan, el Porcentaje negativo significa que existe una presencia negativa de la bacteria correspondiente en el conducto (la ausencia de la misma).

Tabla # III: Frecuencia dentro de los conductos para el *Fusobacterium Sp* y el *Enterococcus Sp*.

	Fusobacterium Sp.		Enterococcus Sp.	
	N^o	%	N^o	%
Débil	5	18,52	0	0
Intermedio	4	14,81	0	0
Fuerte	5	18,52	0	0
Muy Fuerte	0	0	0	0
Negativa	13	48,15	27	100
Total	27	100	27	100

La siguiente tabla muestran las señales que se obtuvieron del *Fusobacterium* dentro de los 27 conductos con sus respectivos porcentajes.

Gráficos 3 y 4: Frecuencias obtenidas dentro de los conductos para el *Fusobacterium Sp.*



La bacteria *Fusobacterium Sp* estuvo en un 48,15 % ausente en el conducto y mostró una señal fuerte de 18,52% de las muestras.

6. DISCUSION.

Los métodos moleculares particularmente el método PCR, han suministrado significativamente un conocimiento adicional en la composición de la microbiota endodóntica por permitir la detección de especies bacterianas, que son difíciles y aun imposibles de cultivar (Siqueira, 2003c). Además, han permitido la identificación de bacterias antes no encontradas en los conductos, así como también, cambios taxonómicos en sus especies (Siqueira 2003a).

El tercio apical del sistema del canal radicular, puede ser considerado como una zona crítica para el éxito de la terapia endodóntica, el conocimiento de la microbiota que infecta esta área es un parámetro importante, la anatomía y el contacto con los tejidos vivos le confiere condiciones ecológicas especiales para seleccionadas especies que colonizan esta región. La baja tensión de oxígeno en el tercio apical del canal radicular, conduce al establecimiento de bacterias anaerobias estrictas. En adición, bacterias localizadas en la porción apical del canal radicular, pueden obtener muchos nutrientes de los fluidos tisulares y del exudado inflamatorio presente, entre los tejidos perirradiculares y el canal infectado (Siqueira, 2004).

Estudios han revelado, que especies del género *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Peptostreptococcus* son comúnmente asociadas con infecciones primarias endodónticas (Siqueira, 2003c).

En este estudio el *Fusobacterium Sp*, fue detectado en un 51,85 % de las muestras (ver gráfico N° 2: Frecuencia del *fusobacterium Sp* en los conductos), y los resultados de los hallazgos

estuvieron muy cercanos a los estudios de Young Jung (Young Ll et al; 2000), quienes demostraron que el *Fusobacterium Sp.* fue la bacteria mas comúnmente aislada en un 68,4 % de las muestras, en pacientes con necrosis y lesión apical, en donde la misma se clasificó como patógeno putativo endodóntico.

Así mismo Baumgartner estableció, que existen diferencias estadísticamente notables, en la prevalencia de algunas bacterias con respecto a la localización geográfica donde se tomen las muestras. En un estudio realizado en Portlan Oregon, y en Rió de Janeiro Brasil, donde buscaban la prevalencia del *Fusobacterium nucleatum*, una vez tomadas la muestras los resultados fueron los siguientes; en Oregon, la bacteria estuvo presente en un 73% de los casos, muy cercanos a los resultados de este estudio, no ocurrió de la misma forma en Rió de Janeiro Brasil donde los datos de la prevalencia de la bacteria no coincidieron con los resultados de la muestras de Oregon Portlan (Baumgartner et al; 2004). Luego estudios de Siqueira (Siqueira et al 2005), en el Sur de Corea, fue la especie mas prevalente en infecciones primarias endodónticas; el *F. nucleatum*, estuvo presente en un 38% de las muestras tomadas.

El Fusobacterium, es una bacteria Gram negativa, evidencias indican que estas bacterias son el mayor patógeno endodóntico involucrado en infecciones primarias endodónticas del canal radicular (Siqueira 2003c).

En un estudio realizado por Chávez con el uso del método PCR, para detectar la presencia de bacterias en conductos con necrosis y lesión apical, una de las bacterias más prevalentes, fue el

F. nucleatum, esta bacteria es la más comúnmente hallada en estos casos (Chávez, 2002). Datos que concordaron con esta investigación.

Estudios epidemiológicos han mostrado, que esta especie es una de las más prevalentes en infecciones primarias del canal radicular (Moraes et al, 2002), está asociada y contribuye a las reagudizaciones endodónticas.

Ávila C. (2003); sugirió que el *Fusobacterium*, es considerado por tener un rol importante en la enfermedad periodontal. Sus estudios demostraron, una fuerte correlación entre la presencia de estos microorganismos y la destrucción del tejido periodontal.

En un estudio realizado por Siqueira et al (2004); para la selección de patógenos endodónticos desde los últimos milímetros apicales del canal radicular, de 23 muestras tomadas de los canales radiculares infectados, esta bacteria se encontraba, en el 26% de los casos, concluyendo así que el *Fusobacterium*, es una de las especies más comúnmente encontrada en los conductos en infecciones endodónticas primarias.

Esto nos lleva a concluir que el *fusobacterium* es una especie que se puede hallar en gran proporción desde infecciones primarias hasta en los casos de necrosis con lesión apical, además, en los dientes que presentan enfermedad periodontal, independientemente del diagnóstico pulpar que presente en ese momento, puede ser una vía de comunicación para que se presente en el sistema de conductos.

En los últimos años, la mayoría de los estudios para la detección de especies como el *Enterococcus* se realizan con métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa. El *Enterococcus*, es una bacteria oral común, es conocido por producir infecciones oportunistas, y tener una fuerte habilidad de resistir a los desinfectantes, además de ser dificultosa para removerla desde el canal en tratamientos endodónticos (Mamoru N. 1999).

Mamoru N (1999); realizó un estudio, en los cuales se les tomó una muestra del exudado inflamatorio a conductos radiculares y que luego de realizar la limpieza, remodelado y respectiva medicación, encontraron esta bacteria en 5 de las 22 muestras tomadas.

En un estudio publicado por H. Hancock et al (2001); en una población al Norte de América, se determinó la composición de la microflora presente en muestras de conductos radiculares que presentaban infecciones persistentes aun luego del tratamiento endodóntico, el estudio fue realizado desarrollando el crecimiento de las bacterias bajo condiciones anaeróbicas, el resultado fue el siguiente: la bacteria *E faecalis*. estuvo presente en un 30% de las muestras analizadas.

En un estudio realizado por Sunde (Sunde P, 2002); en casos de necrosis y lesión periapical especies de *Enterococcus* estaban presentes en 3 de 36 muestras, (8,3% de los casos).

Pruebas con PCR demuestran, que el *E. faecalis*. no es una bacteria tan prevalente en infecciones primarias, como sí lo es en infecciones persistentes o secundarias. Sin embargo se ha observado, la prevalencia de esta bacteria en huéspedes con infecciones primarias (Rocas I, 2004). Siqueira realizo un estudio en el año 2002, con el método de Reacción en Cadena de la

Polimerasa, en el mismo estudiaron 53 dientes infectados con necrosis y lesión apical, el *E. faecalis* estuvo presente en un 11,5% de las muestras analizadas (Siqueira J. et al, 2002c).

Siqueira y Rocas en su estudio (2002c); reportaron que las bacterias Gram positivas han mostrado ser mas resistentes al tratamiento endodóntico. Siqueira Rocas et al (2004); Sugirieron; que el *Enterococcus*, es ocasionalmente aislado desde infecciones primarias endodónticas, pero prevalentemente recuperado, en casos de retratamiento por fallas endodónticas.

Rocas I, (2004); sugirió que el *E. faecalis*, ha sido solo ocasionalmente hallado en casos de infecciones endodónticas primarias, como ocurrió en este estudio (ver tabla No III; Frecuencia del *Enterococcus Sp* en los conductos). Por otra parte, esta especie ha sido frecuentemente aislada en los últimos años, en casos en donde la terapia endodóntica ha fallado, encontrándose en un 64% de las muestras analizadas, lo que confirma que esta bacteria está fuertemente asociada con persistencia de lesiones en fracasos en el tratamiento endodóntico. De la misma forma sugirió, que el *E. faecalis*, se encuentra más significativamente asociado a casos asintomáticos que a los casos sintomáticos, y fue detectada en 20 de 30 casos de persistencia de infección endodóntica asociado con dientes ya obturados.

Algunos autores definen con factores de virulencia al *Enterococcus*, los cuales están implicados en la causa de las enfermedades, éstos incluyen: citolisinas (lisis de las células madre), enzimas líticas, tales como; (Hialuronidasa, Gelatinasa), las cuales están implicadas en el daño a los tejidos, ácidos lipoproteicos (involucrados en la adhesión de la superficie del huésped, la estimulación de las citoquinas por los Monocitos). Algunos de estos factores, juega

un rol importante en la patogénesis de las enfermedades perirradiculares. Sin embargo la mayor participación, del *E. faecalis*, se sugiere que es en los casos asintomáticos de enfermedad perirradicular. La especie de *Enterococcus* es un microorganismos que en general, no son altamente virulentos y que su aparición como patógenos puede estar relacionada a la resistencia contra muchos agentes antimicrobianos, mas que a su alta virulencia (Rocas. I, 2004). Además estudios han confirmado que el *Enterococcus*, es resistente a la Vancomicina (Banerjei. L, 2003).

En este estudio el *Enterococcus*, no estuvo presente significativamente, lo cual concuerda con estudios que indican que esta bacteria puede estar asociada a casos de infecciones primarias pero en muy baja proporción, como lo mostraron estudios anteriores, ya que se encuentra la mayoría de las veces en los casos de fallas endodónticas. Los hallazgos de este estudio sugieren que esta especie puede ser inhibida por otros miembros del grupo mixto bacteriano comúnmente presente en infecciones primarias, y que las condiciones ambientales en dientes ya obturados pueden no prevenir su supervivencia, lo que explicaría su ausencia. Otra causa podría ser, y existen estudios que lo apoyan, el *Enterococcus* tienen la habilidad de penetrar en la profundidad de los túbulos dentinales (Kayaoglu. G. y D. Orstavik., 2004). Siqueira J (2002); Observó, que las bacterias penetraban en los túbulos, alcanzando profundidades de hasta 5 μ m. Esto lo sugirió como el mayor hallazgo en ese entonces.

Esta propiedad puede permitir que estas especies escapen a la acción de los instrumentos endodónticos, y a los irrigantes utilizados durante la preparación químico-mecánica. Además, esta especie es resistente al hidróxido de calcio, comúnmente usado como medicación intraconducto, y tiene la habilidad, de sobrevivir en ambientes con baja disponibilidad de

nutrientes y de volver a desarrollarse, cuando la fuente de nutrientes es restablecida. Todos estos factores ayudan a explicar porqué el *E. Faecalis* es tan prevalente en pacientes en donde el tratamiento endodóntico ha fallado, esta bacteria puede colonizar, los canales radiculares ya obturados (Siqueira. Jr 2004a).

El *E. Faecalis*, puede colonizar los canales de la raíz y producir mono- infecciones, y tal es su relativa independencia de vivir sin nutrientes derivados de otras bacterias, esto es esencial para su establecimiento en canales ya obturados. Finalmente señales del medio ambiente pueden regular la expresión del gen de la bacteria, los cuales pueden permitirle al microorganismo adaptarse a las variantes del medio, esto incluye la habilidad de sobrevivir bajo condiciones de escasez de nutrientes. Todas estas propiedades explican y ayudan a esclarecer su alta prevalencia en casos de fallas endodónticas en canales ya obturados. Rocas. I y Young II. (2004); reportaron que el *E. faecalis* es la principal especie hallada en casos de retratamientos endodónticos en dientes asociados con lesiones periradiculares.

Foad .A. et al (2002); en sus investigaciones han documentado la predecible falla en el tratamiento, al observar la presencia de bacterias cultivables en los canales, al momento de la obturación. Sin embargo los microorganismos más comúnmente asociados con fallas endodónticas, difieren a los que muestran los estudios realizados con métodos de cultivos en canales con necrosis pulpar. Estudios han revelado que la mayoría de estos casos de tratamientos que fallan, tienen bacterias Gram positivas, como especies de *Enterococcus* , *Streptococcus*, y *Eubacterium*, con ocasional *Candida*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium*; sin embargo el *Enterococcus*, es la especie mas prevalente en los casos de falla endodóntica en un rango del

70%., por lo tanto la sensibilidad y exactitud, de las técnicas moleculares son necesarias para caracterizar los irritantes microbianos del canal radicular en orden para determinar su asociación con síntomas clínicos y el pronóstico del tratamiento.

Foad. A. et al (2005); dicen que Investigaciones han sugerido que la presencia en los casos que requieren retratamiento endodónticos debido a la no sanación de lesiones periapicales, pero que han tenido una adecuada restauración coronal, fallaron por la detección de este organismo.

Técnicas moleculares microbiológicas pueden suministrar la sensibilidad para la detección microbiana comparada con los cultivos y también permitir la identificación del *Enterococcus* con una mayor precisión. En un reciente estudio con 16s rDNA (PCR), identificaron este organismo en 77% de casos no sanados (Siqueira, 2004a). Estudios clínicos, en pacientes con historia de diabetes mellitus mostró un reducido éxito de tratamiento en casos con lesiones perirradiculares antes del tratamiento endodóntico, por lo tanto pacientes diabéticos con lesiones perirradiculares pre-operatorias, es menos probable el éxito del tratamiento. La diabetes puede incrementar la incidencia o severidad de la infección tal y como ocurre en el aparato respiratorio o en el tracto urinario, por lo tanto la prevalencia del *Enterococcus*, está incrementada en pacientes con historia es diabetes mellitus (Foad, 2005).

7. CONCLUSIONES.

Apoyado en los resultados del presente estudio, sobre la detección del *Fusobacterium Sp* y el *Enterococcus Sp*, en los casos de diagnóstico de necrosis apical con lesión Periapical:

- Fue posible determinar la presencia de patógenos putativos Endodónticos en los conductos radiculares.
- La bacteria *Fusobacterium Sp*, estuvo en un porcentaje estimado de prevalencia del 51,85%, con un IC de +- 18,85.
- La bacteria *Enterococcus Sp* no estuvo presente en ninguna de las muestras obtenidas.

8. SUGERENCIAS.

Una vez analizados los resultados obtenidos en la investigación, se pueden hacer las siguientes sugerencias para posteriores estudios sobre el tema:

- Detectar la Prevalencia del *Enterococcus faecalis*, en los casos de fracasos endodónticos con el uso de métodos moleculares (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Detectar la Presencia del *Fusobacterium nucleatum*, en los casos de abscesos Dento-Alveolares Agudos, con el uso de métodos moleculares (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Detectar la Prevalencia del *Porphyromonas gingivalis*, en los casos de infecciones primarias endodónticas con el uso de métodos moleculares (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Determinar la asociación del *Enterococcus faecalis*, en casos sintomáticos o asintomáticos de enfermedad periradicular con el uso de métodos moleculares o PCR.
- Detectar la Presencia del *Fusobacterium nucleatum*, en los casos de infecciones primarias endodónticas en pacientes con enfermedad periodontal con el uso de métodos moleculares (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.

9. RESUMEN.

El propósito de este estudio, fue detectar la presencia del *Fusobacterium Sp* y del *Enterococcus Sp*, en los casos de diagnóstico con necrosis pulpar y lesión apical, usando el nuevo método molecular (PCR) o Reacción en cadena de la Polimerasa. Las muestras fueron obtenidas de 27 conductos infectados de pacientes adultos. Se incluyeron, todos los casos que presentaban las siguientes características: lesiones cariosas, pulpa necrótica y evidencia radiográfica de enfermedad perirradicular. Luego de la extracción y evaluación del ADN bacteriano, los resultados indicaron que el *Fusobacterium Sp*. estuvo presente en un 51,85%, mientras que el *Enterococcus Sp*. no estuvo presente en ninguna de las muestras analizadas, por lo que se considera a la Bacteria *Fusobacterium*, como una especie prevalente en casos de diagnóstico de necrosis pulpar con lesión apical, y el *Enterococcus Sp*. como una especie en muy baja proporción o casi ausente, en los casos de infecciones primarias del canal radicular.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Avila C, (2003). "PCR Detection of four Periodontopathogens from Subgingival clinical samples". *Brazilian Journal of Microbiology*.34: 2003. pp: 81-84.
- Baumgartner. J. et al, (2004). "Geographical Differences in Bacteria Detected in Endodontic Infections Using Polymerase Chain. *Journal of Endodontics*. Volumen 30, No. 3, Marzo 2004.
- Baltimore. L, (1997). "Recombinant DNA technology". En: Lodish H, Baltimore D. *Molecular Cell Biology*. Scientific American books. 1997: 254-6.
- Banerjei. L; Paulsen. IT, (2003). "Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*". *Science* 299:2003. pp: 2071-2074.
- Bortoluci F y Galvao De Sousa. S, (2002). "Aplicacoes Da Biologia Molecular Na Odontologia" Conceitos e Técnicas. *Revista de Odontologia de Lins*. Vol 14, No. 2. Julio 2002.
- Chavez. E, (2002). "Fusobacterium nucleatum in endodontics flare-ups". *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Volumen 93, Número 2, Febrero 2002.

- Cohen. S y R Burns (2002). *Vías de la Pulpa*. 8va Edición, Editorial Mosby.
- Costa. J (2005). “Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo Real” *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(5): 299-305. 2004
- Fouad. A.F. et al, (2002).”PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endontic Infection”. *Journal of clinical microbiology*. Vol 40, Número 9. Septiembre 2002, pp: 3223-3231.
- Foaud. A. et al, (2005). “Molecular detection of Enterococcus species in root Canals of therapy-resistant endodontic infections”. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Volume 99, Número 1. Enero 2005.
- G. Haraldsson, W. P et al, (2002). ”Clonal Persistence of Oral Fusobacterium nucleatum in Infancy”. *Journal Dental Research*. 83(6): 500-504, 2004.
- Hancock. H. y Sigurdsson A, (2001). “Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population”. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Volumen 91, Número 5, Mayo 2001.
- Hommezz et al, (2002) “Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings”. *International Endodontic Journal*, 35, pp: 680-689, 2002.

- Hommez et al, (2004). "Investigation of the effect of the coronal restoration quality on the composition of the root canal microflora in teeth with apical periodontitis by means of T-RFLP analysis". *International Endodontic Journal*, 37, pp: 819-827, 2004.
- Ingle. John I. (2002). "Endodoncia". 5ta Edición, Editorial MacGraw-Hill. Interamericana.
- Kayaoglu. G. y D. Orstavik, (2004). "Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease" International and American Associations for Dental Research 15(5): pp; 308-320 .2004.
- Larrick JW, (1997). "The PCR Technique: Quantitative PCR". Biotechniques Books. Eaton Publishing. 1997.
- Liebana U.J., (2002). *Microbiología Oral*. 2edición .editorial McGraw-Hill interamericana España.
- Mamoru Noda; Satoshi Inoue, (1999). "A Comparison of Methods For Detecting Bacteria in Root Canal Exudate". *Journal of Endodontic* , Volumen 25, Número 3, Marzo 1999.
- Miller .W, (1894). " An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp" *Dent cosmo* 36:5005 1894.
- Moraes, S; Siquiera. Jr, (2002). " Comparison of the Effectiveness of Bacterial Culture,

16S rDNA Directed Polimerase Chain Reaction, and Checkerboard DNA-DNA Hibridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic Infections”. *Journal of Endodontic* Volumen 28, Número 2. Febrero 2002.

- Munson. M.A. et al, (2002). “Molecular and cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections”. *Journal dental research* 81 (11): pp: 761-766, 2002.
- Negroni M., (2004). *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica*. 1era Edición, Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana.
- Oliveira. L.; Carvalho. C, (2005). “Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules”. *Brazil Oral Research*. 19(1): pp: 5-10. 2005.
- Rocas, I; R. Kátia, (2004). “Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular disease”. *Journal of endodontic* . Volumen 30 , Número 5, Mayo 2004.
- Rocas I, II-Young. J, (2004). “ Polymerase Chain reaction Identification of Microorganisms in Previously Root-filled Teeth in a South Korean Population”. *Journal of endodontics*. Volumen 30, No. 7. Julio 2004.

- Siqueira et al, (2002a). "Patterns of microbial colonization in primary root canal infections". *Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. Vol 93. Número 2, Febrero 2002.
- Siqueira, (2002b). "Endodontic infections: concepts, Paradigms, and perspectives". *Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. Vol 94, Número 3. September 2002.
- Siqueira J.F, I. Rocas, (2002c). " Actinomyces Species, Streptococci, and Enterococcus faecalis in Primary Root Canal Infections. *Journal Of Endodontics*. Volumen. 28, Número 3, Marzo 2002.
- Siqueira J.F. et al., (2002d). "Comparison of 16S rDNA-based PCR and Checkerboard DNA-DNA Hybridization for detection of selected endodontic pathogens". *Journal Medical Microbiology* Vol 51. pp: 1090-1096. 2002.
- Siqueira, J.F, (2003a). "Taxonomic Changes of Bacteria Associated with Endodontic Infections" *Journal of Endodontic*. Volumen 29, Número 10, Octubre 2003.
- Siqueira. Jr, (2003b). "Microbial causes of endodontic Flare-ups". *International Journal Endodontic*. 36, pp: 453-463 Febrero 2003.

- Siqueira Jr, (2003c). "Peptostreptococcus micros in Primary Endodontic Infections as Detected by 16S rDNA-based Polymerase Chain Reaction". *Journal of Endodontic*. Volumen 29, Número 2, Febrero 2003.
- Siquiera, J.F et al, (2004). "Selected Endodontic Pathogens in the Apical third of infected Root Canals: A Molecular Investigation". *Journal of Endodontic*. Volumen 30, Número 9, Septiembre 2004.
- Siqueira Jr et al, (2004a). "Polymerase Chain Reaction-Based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment". *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Volumen 97, Número 1. Enero 2004.
- Siqueira J. F; Young, II, (2005). "Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations". *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Volumen 99, Número 5. Mayo 2005.
- Siqueira J.F; I. Rocas, (2005a). " Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1-Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *Journal of endodontics*. Vol. 31, No. 6. June 2005.

- Siqueira J.F; Rocas I, (2005b). “ Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2-Redefinig the endodontics Microbiota. *Journal of Endodontics*. Vol. 31, Número 6. June 2005.
- Sunde, P. et al, (2002).” Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy”. *Journal of Endodontic*. Volumen 28, Número 4, Abril 2002.
- Walton. R; Torabinejad. M, (1996). *Principles and Practice of endodontics*. 2da edición, W.B. Saunders Company. cap 16.pp: 277.
- Weine. S, (1997). *Tratamiento Endodónico*. 5ta Edición, Madrid España Editorial Harcourt Brace.
- Wells, J. D et al, (2002). “Intracoronaral sealing ability of two dental cements”. *Journal of endodontics*. Vol. 28 No.6. 2002. pp: 443-447.
- Young .II. and Bong-Kyu Choi, (2000). “Molecular Epidemiology and association of Putative Pathogens in root Canal infection”. *Journal of Endodontics*. Volumen 26. Número 10, October 2000.
- Yuang-Ling., Spratt. S, (2002). “Development of contemporary decontamination protocols for study of root-canal flora by cultivation and molecular techniques”. *International Endodontic Journal*. 35, pp: 79-119, 2002.

- Yuan-Ling. Ng., D. Spratt, (2003). "Evaluation of Protocols for field Decontamination Before Bacterial Sampling of Root Canals for contemporary Microbiology Techniques. *Journal of endodontics*. Volumen 29. Número. 5 May 2003.