

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
UNIDAD ACADÉMICA DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Fusobacterium nucleatum* EN
PACIENTES DEL POSGRADO DE ENDODONCIA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE YUCATÁN, CON PERIODONTITIS APICAL CRÓNICA**

TESIS

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN ODONTOLOGÍA

Presenta:

GABRIEL ALVARADO CÁRDENAS

Directores de Tesis

M.O. NARDA YADIRA AGUILAR OROZCO
M. EN C. SANDRA ELENA HERNÁNDEZ SOLÍS

Tepic, Nayarit, diciembre de 2010



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

Tepic, Nayarit, 6 de diciembre de 2010.
Oficio No. 139/10.

C.D. Gabriel Alvarado Cárdenas
Candidato a Maestro en Odontología
Presente.

En virtud de haber recibido información de los revisores asignados por esta Comisión acerca de que el trabajo de tesis de Maestría titulado: **Identificación molecular de Fusobacterium nucleatum en pacientes del posgrado de endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán, con periodontitis apical crónica**, en la cual participan como Directores M.O. Narda Yadira Aguilar Orozco y M.C. Sandra Elena Hernández Solís, ha sido revisada y se han extendido en forma escrita las recomendaciones que ellos han considerado necesarias, en nuestra calidad de cuerpo colegiado, estamos otorgando autorización para que se proceda a la impresión de dicho trabajo.

Una vez concluidos los trámites administrativos correspondientes, le serán notificados lugar, fecha y hora, donde se llevará a cabo el examen de grado defendiendo su tesis con réplica oral.

ATENTAMENTE
"POR LO NUESTRO A LO UNIVERSAL"

M.O. Rogelio Escalante Peña

Por la Comisión Asesora Interna de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación.

REGISTRADO EN
OF. 147426



C.c.p. - Interesado
C.c.p. - Archivo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nayarit por brindarme la confianza y aceptarme en su Programa de Maestría permitiéndome crecer profesionalmente.

A la Facultad de Odontología de la U.A.D.Y. por todo su apoyo durante estos 2 años, así como al Departamento de Microbiología de la misma, por el tiempo y asesoría que me brindaron durante la realización de este proyecto.

A mis Directoras de tesis, M. en O. Narda Yadira Aguilar Orozco y M. en C. Sandra Elena Hernández Solís por todo el apoyo, respaldo y tiempo que dedicaron para elaborar este trabajo de investigación.

A mi esposa Luz y mi hijo Gabriel que siempre fueron mi motivación y fuente de apoyo durante estos últimos años. Gracias por la paciencia y la confianza que me brindaron.

A mi padre Gabriel y mi madre Addy, por todo el apoyo que me han brindado durante toda la vida, siempre serán mis ejemplos a seguir.

RESUMEN

Las patologías de origen pulpar constituyen uno de los padecimientos de mayor frecuencia en la cavidad bucal, manifestándose principalmente como pulpitis, periodontitis o abscesos periapicales. Una de las bacterias más frecuentemente asociada a infecciones endodónticas, es *Fusobacterium nucleatum*.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *Fusobacterium nucleatum* en pacientes con periodontitis apical crónica que acudieron al Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

El estudio fue descriptivo, observacional y transversal. Se tomaron muestras de 92 conductos radiculares y de éstas en 83 fue posible extraer el DNA, a las que se les realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de *F. nucleatum*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	17
III. RESULTADOS	22
IV. DISCUSIÓN	23
V. CONCLUSIONES	24
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
VII. ANEXOS	30

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias presentes en el interior de los conductos radiculares son la principal causa de patologías periapicales como la periodontitis apical crónica. La periodontitis apical crónica, es una infección endodóntica primaria, la cual está compuesta por una microflora mixta dominada por bacterias anaerobias gram-negativas. Por otro lado, las bacterias endodóntica podrían estar implicadas en complicaciones extra-orales, como la sinusitis maxilar crónica, la celulitis orbitaria, endocarditis infecciosa, la artritis reumatoide y abscesos cerebrales (Saito *et al*, 2006). *F. nucleatum* es una de las bacterias más frecuentemente asociada a infecciones endodónticas (Fouad *et al*, 2002) y ha sido posible recuperarla en el torrente sanguíneo después de 10 minutos del tratamiento endodóntico (Moromi, 2004). Por otro lado, también se ha visto que su asociación con otras especies bacterianas como *P. gingivalis* y *P. intermedia* en cultivos mixtos puede aumentar la patogenicidad de dichos microorganismos (Baungartner *et al*, 2002) y que su combinación con *Streptococcus spp.* se asocia significativamente con la presencia de síntomas preoperatorios (Fouad *et al*, 2002).

Existen diversos estudios encaminados a identificar los microorganismos presentes en la microflora endodóntica, sin embargo, sus resultados varían considerablemente, esta variación puede deberse, al menos en parte, a la disminución de la fiabilidad y sensibilidad de las técnicas de cultivo microbiológicas empleadas.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de diagnóstico molecular que permite detectar tanto a microorganismo cultivables como los no cultivables, posee alta especificidad y sensibilidad y permite la identificación rápida y precisa de una gran variedad de especies microbianas.

La literatura demuestra que es muy distinta la microflora bacteriana que se encuentra en los diferentes tipos de infecciones endodónticas, por lo que es de gran importancia la detección e identificación de los microorganismos asociados a estas infecciones.

En México no existe algún tipo de estudio mediante el uso de PCR que evidencie la prevalencia de *Fusobacterium nucleatum* en dientes con periodontitis apical crónica.

Con base en lo anterior, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la prevalencia de *Fusobacterium nucleatum* en los conductos radiculares de dientes con periodontitis apical crónica?

Microbiología de las infecciones endodónticas

La endodoncia se define como la rama de la odontología que se ocupa del diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades pulpares con o sin complicaciones periapicales (Mondragón, 1995).

Entre los principales objetivos del tratamiento endodóntico, está la eliminación de todos los microorganismos que existen en el sistema de conductos radicular y de esta forma eliminar la infección o prevenir la reinfección de los espacios pulpares y de los tejidos periapicales (Cohen y Burns, 2002).

Diferentes estudios mencionan a las bacterias como el principal enemigo de los tratamientos endodónticos, así como la importancia de las diferentes medidas terapéuticas para la erradicación de las mismas (Cohen y Burns, 2002).

SISTEMA DE BIBLIOTECAS



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Los microorganismos que se encuentran en el tejido pulpar necrótico se han establecido como la principal causa de inflamación periapical aguda y crónica. Sin embargo, pasaron casi 200 años antes de que los microorganismos del conducto radicular estuvieran bajo investigación biológica. Un estudio realizado por Miller, demostró invasión bacteriana tanto en túbulos dentinarios como en tejido pulpar necrótico (Cohen y Burns, 2002).

La teoría de la infección focal, que data de los años 1920-1928, menciona que los dientes infectados podrían causar infecciones en otras partes del cuerpo, así como también enfermedades sistémicas. Esto trajo consigo extracciones masivas en todo diente sospechoso de portar infección, y retrasó el origen del tratamiento endodóntico, pero igual trajo consigo los principios de tratamientos biológicamente sanos, incluyendo la eliminación de la infección (Cohen y Burns, 2002).

Durante la necrosis pulpar, las bacterias, sus productos y los mediadores inflamatorios se acumulan en el sistema de conductos radiculares y se pueden diseminar más allá del foramen apical y provocar lesiones en los tejidos periodontales. Debido a que estas lesiones son de naturaleza inflamatoria, y siempre están localizadas en el periápice, las infecciones de este tipo se conocen como periodontitis apical (Molander *et al*, 1998).

La periodontitis apical posee una función protectora importante y busca prevenir la diseminación de las bacterias y sus elementos a otros espacios del cuerpo, ya que limita la infección al espacio del conducto radicular y previene que se disemine. Por lo tanto, a pesar de que a la periodontitis periapical se le considera una lesión, también debe ser considerada como una importante zona inflamatoria, amortiguadora y protectora. No obstante, en ocasiones el proceso puede asociarse con síntomas clínicos severos y, aunque es raro,

también puede ser una condición que ponga en riesgo la vida. Casi siempre, la periodontitis apical permanece sin síntomas y por lo tanto no es muy notorio para el paciente, por lo que solo será revelada por un examen radiográfico de rutina (Molander *et al*, 1998).

La periodontitis apical evoluciona principalmente como una respuesta al ataque bacteriano que surge de una pulpa necrótica infectada. Las bacterias infectan la pulpa después de una lesión, por lo general caries, trauma dental o lesión iatrogénica (Silva *et al*, 2006).

Una vez que se establece la infección del conducto radicular sin tratar, permanece como un proceso crónico y expone al organismo de forma continua a los elementos bacterianos (Silva *et al*, 2006).

En la periodontitis apical crónica el paciente se encuentra asintomático, con lesión periapical radiográficamente visible, con frecuencia el paciente no reporta historia de dolor en el diente y las pruebas de vitalidad y de preparación de la cavidad, confirman el estado necrótico de la pulpa. Ocasionalmente, puede haber agudización de la lesión crónica, causando inflamación y dolor del área, comúnmente llamado "absceso fénix" o exacerbación aguda de una periodontitis apical crónica (Hashioka *et al*, 1992).

Un estudio reportó la presencia de un alto porcentaje de bacterias anaerobias estrictas, demostrando la necesidad de emplear medios de cultivo adecuados y técnicas para la identificación de microorganismos anaerobios para el avance del conocimiento de la microbiología del sistema de conductos radiculares (Fabricius *et al*, 1982).

En general, las especies más frecuentemente encontradas en una infección primaria pertenecen al género *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomices* y *Streptococcus* (Fabricius *et al*, 1982).

Existen diferentes tipos de infecciones endodónticas del sistema de conductos radiculares, las cuales usualmente están asociadas a condiciones clínicas distintas. Se describen cuatro tipos: primaria, secundaria, persistente y extrarradicular (Siqueira *et al.* 2004).

La infección primaria es aquella causada por la colonización de microorganismos en el tejido pulpar necrótico. La microbiota involucrada frecuentemente depende del tiempo de infección, aunque también se ha sugerido que puede diferir según el tipo de lesión perirradicular asociada. Mientras que un amplio rango de microorganismos se asocian a lesiones perirradiculares crónicas, un grupo más restringido de especies se asocian a lesiones perirradiculares sintomáticas como la periodontitis apical aguda y el absceso perirradicular agudo (Hashioka *et al.* 1992).

Las infecciones secundarias son causadas por microorganismos ausentes durante la infección primaria y que han penetrado al sistema de conductos radiculares, ya sea durante el tratamiento endodóntico, entre citas o después de haber culminado. En estos casos, si estos microorganismos logran sobrevivir y colonizar el sistema de conductos, se establecerá la infección secundaria (Hashioka *et al.* 1992).

Otro tipo de infección endodóntica es la infección intrarradicular persistente. Esta es causada por microorganismos involucrados en la infección primaria o secundaria (Siqueira *et al.* 2004).

En cuanto a las infecciones endodónticas extrarradiculares, éstas pueden ser primarias, secundarias o persistentes. La forma más común es el absceso perirradicular agudo y la fuente de infección es usualmente la infección intrarradicular. (Silva *et al.* 2006).

Por otro lado, se ha observado que algunas especies microbianas son capaces de resistir los cambios de ambiente efectuados durante la terapia endodóntica, y cuando esto sucede se presenta el fracaso del tratamiento de conductos (Lana *et al.*, 2001).

Después de Miller en 1890, se desarrollaron múltiples investigaciones sobre la microbiota de los conductos radiculares las cuales reportaron la presencia de numerosas especies bacterianas. Dependiendo del medio de cultivo y las técnicas utilizadas para la identificación bacteriana, los tipos y el número de organismos aislados variaban significativamente (Kakehashi *et al.*, 1965).

En las primeras investigaciones se reportó una pequeña incidencia de bacterias anaerobias en infecciones primarias, mientras que en estudios posteriores se informó de una prevalencia del 90% de estas bacterias en conductos radiculares infectados (Kakehashi *et al.*, 1965).

Las pulpas necróticas presentan una flora polimicrobiana caracterizada por una amplia variedad de combinaciones de bacterias, un promedio de 4 a 7 especies por conducto, predominantemente anaerobias y aproximadamente igual proporción de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Kakehashi *et al.*, 1965).

Se ha demostrado una correlación entre el tamaño de la lesión periapical y el número de especies bacterianas presentes en el sistema de conductos radiculares. Dientes con grandes lesiones usualmente alojan mayor número de especies bacterianas y mayor densidad de bacterias en el conducto radicular que aquellos dientes con lesiones pequeñas (Kakehashi *et al.*, 1965).

Existen varios factores capaces de influenciar la colonización microbiana en el interior del sistema de conductos radiculares. La disponibilidad de nutrientes, la baja tensión de oxígeno molecular en pulpas necróticas y las interacciones microbianas pueden ser determinantes en la ecología del sistema de conductos radiculares (Lana *et al*, 2001).

En un estudio con ratas, se demostró la función esencial de los microorganismos en la patogénesis de las lesiones periapicales. Cuando las pulpas dentales de ratas gnotóbicas eran expuestas a la cavidad oral, las pulpas permanecían vitales y ninguna patología periapical era detectada radiográficamente. Sin embargo, cuando los animales eran expuestos a la flora bacteriana normal de otros animales, la pulpa se necrosaba y se desarrollaban lesiones periapicales (Kakehashi *et al*, 1965).

Sundqvist demostró, que la periodontitis apical solo era detectable en piezas dentales que contenían bacterias en el conducto radicular, mientras que las piezas con conductos necróticos pero estériles no presentaban radiográficamente signos de patosis periapical y así mismo encontró que la bacteria más frecuentemente aislada en conductos fue el *Fusobacterium nucleatum* (Sundqvist *et al*, 1989).

Lana *et al*, analizaron las especies involucradas en las infecciones endodónticas. Sus resultados mostraron el aislamiento de 308 microorganismos en 27 (87.1%) conductos radiculares estudiados, logrando identificar en 278 (90.3%) el género y especie. Por otro lado, también se observó que el 81.5% de los conductos mostraron infecciones polimicrobianas, el número de especies aisladas en cada conducto infectado fue de 1 a 11 especies, con un promedio de 5 especies por conducto. En 88.9% de los conductos fueron aislados microorganismos anaerobios estrictos, en 51.8% anaerobios facultativos, en 18.5%

microaerófilos y en 7.4% de los conductos se aislaron hongos. Los autores hacen énfasis en la calidad polimicrobiana de la flora endodóntica predominantemente mixta, con predominio de bacilos anaerobios gram-negativos (Lana *et al.* 2001).

El desarrollo de técnicas microbiológicas ha hecho posible el cultivo, aislamiento e identificación bacteriana. En las lesiones periapicales generalmente se presentan infecciones polimicrobianas, dominadas por bacterias anaeróbicas obligadas. El número de especies diferentes por cada caso es relativamente pequeño, normalmente entre dos y ocho y prácticamente nunca mayor de veinte especies en un solo conducto (Rolph *et al.* 2001).

Los microorganismos presentes en conductos infectados comprenden un número restringido de especies comparadas con el total de la microflora bucal. La mayoría de las especies encontradas en conductos radiculares también han sido aisladas de bolsas periodontales, sin embargo, la microbiota endodóntica no es tan compleja como la periodontal (Rolph *et al.* 2001).

Para que un microorganismo pueda establecerse en el sistema de conductos radiculares y consecuentemente participar en la etiopatogenia de las lesiones perirradiculares requiere de ciertas características:

1. El microorganismo debe presentarse en un número suficiente para iniciar y mantener la lesión perirradicular.
2. El microorganismo debe poseer una matriz de factores de virulencia, la cual debe expresarse durante la infección del conducto radicular.

3. El microorganismo debe estar localizado espacialmente en el sistema de conductos radiculares de tal manera que sus factores de virulencia puedan ganar acceso a los tejidos perirradiculares.
4. El ambiente del sistema de conductos radiculares debe permitir la supervivencia y crecimiento del microorganismo y proveer señales que estimulen la expresión de virulencia.
5. Los microorganismos inhibidores deben estar presentes en bajo número o ausentes en el microambiente del sistema de conductos radiculares.
6. El hospedero debe desarrollar una estrategia de defensa a nivel de los tejidos perirradiculares, con la finalidad de inhibir la diseminación de la infección. Este proceso dará como resultado un daño tisular (Siqueira *et al.*, 2004).

F. nucleatum, es un bacilo anaerobio estricto, Gram negativo, inmóvil, no formador de esporas, perteneciente al phylum *Fusobacteria*, que habitualmente se presenta en la cavidad bucal y ha sido frecuentemente aislado en conductos radiculares infectados así como también en abscesos endodónticos (Sundqvist *et al.* 1989).

Se reportan siete tipos de *Fusobacteria*, sin embargo los más comúnmente aislados en infecciones humanas son el *Fusobacterium nucleatum* y el *Fusobacterium necrophorum* (Rogerio *et al.*, 2008).

F. nucleatum ha sido reportada como la especie encontrada con mayor frecuencia en conductos necróticos y ha sido asociado a casos con sintomatología dolorosa y agudizaciones endodónticas (Fouad *et al.*, 2002).

Se han llevado a cabo diversos estudios que reportan la prevalencia de *F. nucleatum* en infecciones endodónticas. Kantz y Henry en 1974, llevaron a cabo una evaluación bacteriana de piezas no vitales, presumiblemente infectadas y cuya cámara pulpar se encontraba fuera de contacto con la cavidad oral. De 104 especies anaerobias aisladas, 41 (39%) pertenecieron a *Fusobacterium spp.*

Sundqvist, en 1976, llevó a cabo estudios bacteriológicos en piezas con pulpas necróticas. De 18 piezas investigadas, *Fusobacterium nucleatum* estuvo presente en 7 (33%). Fabricius *et al* en 1982, evaluaron la complejidad de la flora bacteriana en abscesos agudos de origen endodóntico, mediante la identificación y enumeración de las especies predominantes. Del total de bacterias aisladas, los bacilos anaerobios gramnegativos fueron el mayor grupo aislado (37%). De estos, el *Fusobacterium nucleatum* fue la segunda especie más prevalente con un 14%, encontrándose en 6 de los 10 casos estudiados. HeimdaHL, en 1985, reportó una prevalencia del 34% de *F. nucleatum* y que su presencia pudiera estar asociada con la severidad de infecciones endodónticas agudas. Haapasalo, en 1986, realizó un estudio para examinar la composición de la microflora anaerobia de cavidades pulpares infectadas. De un total de 19 casos, fueron hallados anaerobios estrictos en 14 (74%) y *F. nucleatum* fue encontrado en 3 (16%).

Sundqvist en 1994, llevó a cabo una recopilación de los resultados de varios estudios realizados y menciona a *F. nucleatum* como la bacteria más prevalente de la micro flora de los conductos radiculares infectados. Lo señala con una prevalencia del 48%. Siqueira en 1995, reportó un caso clínico que presentó sintomatología persistente, inclusive luego de la instrumentación y medicación intraconducto. El análisis microbiológico reveló la presencia de *F. nucleatum* como el principal agente etiológico. En otro estudio, encontraron una

prevalencia del 26% (Siqueira y Rocas, 2004) y Fouad en conductos radiculares infectados con pulpa necrosada encontró una prevalencia del 82% (Fouad *et al.* 2002).

Por otro lado, se ha visto que esta especie es capaz de agruparse con otras bacterias orales y endodónticas y que también es responsable en las etapas iniciales y finales de la formación del biofilm (Rogerio *et al.* 2008).

La asociación sinérgica del *F. nucleatum* con *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Peptostreptococcus micros* puede incrementar su potencial patogénico (Rogerio *et al.* 2008).

De igual forma se ha reportado que infecciones sistémicas de *Fusobacterium nucleatum* en abscesos hepáticos y artritis séptica, fueron de origen dental (Rogerio *et al.* 2008).

Aunque las técnicas de cultivo para el aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios ha mejorado significativamente en las últimas 3 décadas, los hallazgos de los laboratorios son diferentes entre un país y otro (Baumgartner *et al.* 2004).

Aunque estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferentes variaciones en la metodología de identificación, se sospecha de la influencia geográfica de la composición de la microbiota del conducto radicular, ya que *F. nucleatum* ha sido encontrado con una prevalencia del 73% en Estados Unidos mientras que en Brasil dicha prevalencia es del 4%, (Baumgartner *et al.* 2004).

Estos hallazgos sugieren que la composición de la microbiota endodóntica es resultado de la influencia geográfica (Baumgartner *et al.* 2004).

Una multitud de factores puede influir en la colonización exitosa de la cavidad oral por determinado tipo de especies microbianas, los cuales incluyen mecanismos de defensa del huésped, predisposición genética y factores ambientales tales como tipo de suministro de agua de la comunidad, porcentaje de personas dentro de la población infectadas con la misma especie, estrés fisiológico, tabaquismo, frecuencia de visitas al dentista y enfermedades infecciosas. En adición las condiciones climatológicas y hábitos alimenticios son otras variables que pueden influir en la composición de la microbiota (Baumgartner *et al*, 2004).

La microflora de las pulpas necróticas ha sido estudiada por más de 100 años, principalmente por microscopía directa y cultivos, de tal manera que se tiene un amplio conocimiento acerca de la composición, ecología y potencial patológico de la microflora (Cohen y Burns, 2002).

La identificación de la microbiota de los conductos radiculares es importante para conocer el tipo de bacteria o grupo de bacterias que juegan un papel decisivo en el progreso de la enfermedad, si son resistentes a la terapia convencional o bien, estar implicadas en el fracaso endodóntico (Peters *et al*, 2002).

La introducción de las técnicas de cultivo anaeróbico permitió conocer que las bacterias anaerobias estrictas eran las que dominaban en los conductos radiculares infectados y que estas podrían abarcar hasta el 90% del total de la flora (Siqueira *et al*, 2004).

Actualmente el uso de técnicas genéticas para la detección de estos microorganismos ha mostrado que se encuentran en el 60% de dientes necróticos (Peters *et al*, 2002).

En la práctica clínica, los cultivos de los conductos radiculares pueden utilizarse para determinar el estado microbiológico y para evaluar la eficacia del tratamiento antes de obturar el conducto radicular. Sin embargo, existen diversos problemas metodológicos por superar en el muestreo del cultivo debido a la localización de los microorganismos y a la complejidad de la microflora (Lana *et al.*, 2001).

Durante mucho tiempo, los métodos de muestreo, transporte, cultivo e identificación eran inadecuados para los microorganismos anaerobios facultativos y estrictos. Por tanto, eran comunes los cultivos falsos negativos (Lana *et al.* 2001).

Entre las limitaciones del cultivo microbiológico, se encuentran las siguientes:

- Imposibilidad de cultivar todo tipo de bacterias, especialmente anaerobios, en un solo medio de cultivo. Si bien la presencia de anaerobios estrictos en conductos infectados ha sido confirmada, su presencia no es significativa desde el punto de vista clínico pues son destruidos al ser expuestos al aire una vez que se ha penetrado en el conducto y probablemente también son destruidos con la solución de hipoclorito de sodio durante la instrumentación e irrigación del conducto radicular.
- Consume mucho tiempo. Además del cultivo primario se necesitan realizar otro tipo de pruebas microbiológicas enzimáticas para completar la identificación de los microorganismos. Estas pruebas incluyen, el empleo de medios de cultivos enriquecidos y pruebas de fermentación de azúcares.

Como medios de cultivos primarios para el aislamiento se recomiendan: Agar base Shædler, Agar Base Wilkins Chanlgren, Agar Base Columbia entre otros.

No obstante, debido a la dificultad de cultivar y recuperar todos los microorganismos en los medios de cultivo y al tiempo prolongado de las pruebas (3 semanas) para obtener resultados, varios autores recomiendan el uso de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Monbelli et al, 1991).

La técnica de PCR facilita la identificación de especies bacterianas difíciles de aislar mediante técnicas de cultivo convencionales y a la vez, permite evidenciar aquellas cepas bacterianas que muestran diferencias fenotípicas que se traducen en comportamientos clínicos diversos. Otras ventajas de la PCR sobre las técnicas de cultivo, radican en su rapidez, alta especificidad y exactitud de los resultados (Perea, 2004).

Los primeros estudios sobre la microbiología endodóntica, sugerían que la microflora bacteriana se presentaba con un predominio de especies aerobias y anaerobias facultativas sobre anaerobias estrictas (Kakehashi et al, 1965).

También se señalaba un predominio de bacterias sobre hongos, de cocos sobre bacilos y espirilos, y predominio de gram positivos sobre gram negativos, reportándose la presencia de *Streptococcus ssp.*, cocos gram negativos y lactobacilos junto a una variedad de anaerobios (que varían en su resistencia al oxígeno atmosférico) en un número que se suponía era menor del 50% del total de microorganismos aislados (Lin et al, 1992).

Los estudios de Sundqvist, marcan pauta en la tipificación de microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos involucrados en las lesiones pulpares y periapicales, con la introducción de las técnicas de anaerobiosis (Sundqvist, 1992).

La genética molecular, más recientemente empleada para la identificación de patógenos bucales, ha permitido la tipificación de cada vez más especies relacionadas a la infección endodóntica, así como ha conllevado a variaciones en la taxonomía microbiológica, provocando cambios serios en la definición de la microbiota predominante en el sistema de conductos radiculares (Sundqvist, 1992).

Recientemente, han sido reportados nuevos patógenos en infecciones endodónticas, posteriores a la introducción de los métodos de genética molecular (Perea, 2004).

La información obtenida por las múltiples investigaciones llevadas a cabo en infecciones primarias de conductos radiculares conlleva a señalar el carácter mixto y complejo de la microbiota del sistema de conductos radiculares. Con el continuo avance en las técnicas microbiológicas, cada vez más se hace inminente la identificación de especies involucradas en las infecciones pulpares y perirradiculares, así como su repercusión en el mejoramiento de la terapéutica endodóntica (Fouad *et al.* 2002).

A pesar de que la periodontitis apical crónica es una de las patologías periapicales más frecuentes, en México no se tienen datos que reporten la prevalencia de *Fusobacterium nucleatum* en este tipo de infecciones. Por lo que los resultados de este estudio contribuirán a establecer la epidemiología de *Fusobacterium nucleatum* en dientes con conductos radiculares con periodontitis apical crónica de pacientes de la ciudad de Mérida, Yucatán. La identificación de este microorganismo se realizará mediante la técnica de PCR, técnica que debido a su rapidez, alta especificidad y exactitud resulta una útil herramienta para la identificación de especies bacterianas de muy difícil o imposible aislamiento mediante técnicas de cultivo convencionales.

Estudios de este tipo son de importancia clínica ya que proveen bases para la investigación de sustancias antimicrobianas efectivas, así como también el desarrollo de estrategias apropiadas para alcanzar y eliminar los componentes de la microbiota del sistema de conductos radiculares.

Objetivo

Identificar *Fusobacterium nucleatum* en conductos radiculares con periodontitis apical crónica de pacientes atendidos en Posgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán empleando la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Descriptivo, observacional y transversal.

Definición del universo

Pacientes del Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán con diagnóstico de periodontitis apical crónica.

Criterios de inclusión

1. Dientes permanentes con formación radicular completa.
2. Pacientes que dieron su consentimiento para participar en el estudio.
3. Todo diente que pudo ser aislado adecuadamente.

Criterios de exclusión

1. Pacientes con tratamiento de antibióticos durante los últimos tres meses anteriores a la toma de muestra.
2. Pacientes con discapacidad física o mental.
3. Dientes con fractura radicular.
4. Dientes con bolsas periodontales.
5. Dientes obliterados o con calcificaciones.

Criterios de eliminación

1. Conductos con fractura de instrumentos durante el proceso de exploración.
2. Contaminación del campo operatorio durante la toma de la muestra.

Tamaño de la muestra

Noventa y dos pacientes que acudieron al Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la UADY de mayo de 2009 a marzo de 2010 y que presentaron piezas dentales a las cuales se les diagnosticó periodontitis apical crónica.

Preceptos éticos y riesgos

El paciente firmó carta de consentimiento informado (Anexo 2). No existieron riesgos ni para el paciente ni para el investigador.

Procedimiento experimental

Cultivo microbiano de la cepa de referencia

Se utilizó la cepa de referencia de *F. nucleatum* ATCC 25586, la cual fue cultivada en el medio Agar Sangre Schaedler en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas (Anexo 3, foto 1). Posteriormente se congeló para su conservación en caldo Soya Trypticaseína con glicerina al 5% a -82°C.

Toma de muestra de conductos radiculares

1. Se administró la técnica de anestesia necesaria y se aisló el diente con dique de hule.
2. Se colocó material de obturación provisional provisit para evitar la filtración de saliva a través del dique al área de trabajo.
3. Para el área de trabajo se desinfectó el dique, la grapa y la corona del diente con peróxido de hidrógeno al 30% y tintura de yodo al 5%, posterior a esto se limpió con hipoclorito de sodio al 5.25%.

4. Se accedió a la cámara pulpar con fresas de alta velocidad de fisura no.70] estériles, sin empleo de refrigerante.
5. Se determinó la longitud de trabajo con un localizador electrónico apical y se comprobó radiográficamente que esta fuera la correcta.
6. Se instrumentó sin utilizar alguna solución irrigadora, a longitud de trabajo hasta una lima manual número 25 tipo K.
7. Si el conducto se encontró seco, se depositó solución salina estéril para evitar la contaminación proveniente de la cámara pulpar.
8. Las muestras se obtuvieron colocando 3 conos de papel estéril No. 20 durante 1 minuto cada uno en el interior del conducto (en el más amplio, en caso de ser multirradicular) para absorber el contenido del mismo. Las puntas de papel estériles fueron transferidas inmediatamente a un tubo de ensayo con Tris-EDTA 1mM, el cual se selló herméticamente.
9. Los viales con las muestras se congelaron a -70°C hasta el momento de la extracción del DNA.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante la técnica de calentamiento-congelamiento. El vial con las puntas de papel se descongeló a temperatura ambiente, y la muestra se resuspendió en el buffer TE agitando en el vórtex durante un minuto. Para el lavado de la muestra, la suspensión microbiana se transfirió a un tubo de ependorff y se centrifugó a 2500g (6000 rpm) durante 5 minutos. Enseguida el precipitado se resuspendió en 200 μL de agua inyectable estéril y se centrifugó en las mismas condiciones, este paso se realizó tres

veces. Después del último lavado, el precipitado se resuspendió en 200 μ L de agua inyectable y se calentó a 95°C por diez minutos, inmediatamente después se enfrió por cinco minutos a -80°C. El vial se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 3 minutos; para remover los desechos celulares así como las células que no se hayan roto. El sobrenadante fue recolectado y se midió la cantidad de DNA extraído por espectrofotometría para posteriormente ser usado como templado para la amplificación por PCR.

Identificación por el método de PCR

Se utilizó el par de oligonucleótidos específico para *F. nucleatum*, el cual amplifica una secuencia de 500pb:

PRIMER: FN 5047- 1 (DNA) – CAA ATG CTT GTG TCA ATA ATA CT

PRIMER: FN 5047- 2 (DNA) – TTT AGA AAT GGT AGA ATA AT

Se preparó una mezcla de reacción a un volumen total de 25 μ l: 2.5 μ l de buffer PCR 10X, 1 μ l de cada oligonucleótido (0.4 μ M), 0.5 μ l de dNTPs (0.2 μ M), 0.1 μ l de Taq DNA polimerasa (0.5 μ M), 1 μ l del templado de DNA (10ng) y 18.9 μ l de agua inyectable.

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: Calentamiento a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 72°C durante 5 minutos. En cada amplificación se incluyó un control positivo y uno negativo que no contenía el templado de DNA.

Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras amplificadas se colocaron en un gel de agarosa al 1% en Buffer TBE 1X (Tris-EDTA-Borato de sodio) y corrió a un voltaje constante de 70 volts durante 2.5 horas. En cada gel se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. Al cabo de este tiempo, el

gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó con la ayuda de una lámpara de luz UV (Anexo 3, foto 2).



III. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 92 muestras obtenidas de conductos radiculares con periodontitis apical crónica.

Del total de muestras estudiadas, en 83 fue posible aislar DNA y de éstas en 4 (4,81%) se obtuvieron amplificados correspondientes a los oligonucleótidos específicos de *Fusobacterium nucleatum* (Anexo 4).

IV. DISCUSIÓN

La microbiota relacionada a la periodontitis apical crónica no ha sido ampliamente estudiada como la involucrada en pulpas necróticas, sin embargo, se han logrado establecer diferencias significativas en su composición.

La PCR, es una técnica microbiana de alta sensibilidad, usada para la detección e identificación de microorganismos difíciles de cultivar como lo son los de origen endodóntico.

En este estudio la prevalencia de *F. nucleatum* fue del 4.81%, porcentaje muy similar al encontrado por Baumgartner en Brasil, donde mediante PCR identificó 4% de la misma bacteria.

Por otro lado, comparado con estudios realizados en Europa o Estados Unidos, el porcentaje encontrado en esta investigación resulta ser menor, ya que en estos países se ha llegado a reportar una prevalencia del 73% (Baumgartner *et al.* 2004). Fouad, de igual manera, reporta una prevalencia de de *F. nucleatum*.

Otros estudios han reportado diferentes prevalencias, tal es el caso de Kantz y Henry, que en 1974, encontraron una prevalencia del 39%; Sundqvist, en 1992, del 33%; Heimdahl, en 1985, del 34%; Siqueira y Rocas, en 2004, prevalencia del 26%; Haapasalo, en 1986, del 16% y por último Fabricius, en 1982, del 14%. En esta investigación, en 2010, se reporta prevalencia de *F. nucleatum* del 4.81%, resultando baja en comparación con los autores citados.

V. CONCLUSIONES

En este estudio, en 9 muestras no fue posible extraer el DNA, esto probablemente se haya debido a que la muestra tomada de los conductos radiculares no fue suficiente o al tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el traslado al laboratorio para su congelamiento a -70°C , lo que tal vez pudo ocasionar que el DNA se degradara.

Esta investigación, constituye el primer reporte en México de *F. nucleatum* mediante una técnica molecular como la PCR.

Es importante que se lleven a cabo estudios de este tipo, utilizando el mismo protocolo de identificación, para establecer con más precisión la epidemiología de *F. nucleatum* en México.

Una de las ventajas del PCR es la detección rápida y específica de los ácidos nucleicos de microorganismos patógenos en una muestra, con la característica de tener una alta especificidad y sensibilidad. La prueba permite una obtención rápida de resultados y se pueden examinar varias muestras en corto tiempo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cohen, S. y R. Burns, (2002). Vías de la pulpa. 8ª ed., Elsevier Science. pp 506-507.

Baumgartner, JC, Falkler, W. Beckerman, T., (1992) "Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model" en *Oral Microbiol Immunol*. Vol.7 pp.253-256.

Baumgartner, J.C.; Siqueira, J.F.; Xia, T. e I.N. Rocas, (2004) "Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction" en *Journal of endodontics* Vol. 30,numero 3, pp. 141-144.

Fabricius, L.; Dahlen, G.; Ohman, A. y A. Moller, (1982) "Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure" en *Scandinavian Journal of Dental Restauration*. Vol.90 numero 2,pp.134-44.

Fouad, AF; Barry J.; Caimano, M.; Clawson, M.; Zhu, Q.; Carver, R.; Hazlett, K. y JD.Radolf ,(2002) "PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections" en *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.40, pp.3223-3231.

Gomes, BPF.A.; Jacinto, RC.; Pinheiro, ET.; Sousa, ELR.; Zaia ,AA.; Ferraz, CCR y FJ. Souza-Filho, (2005) "*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR" en *Oral Microbiology and Immunology*. Vol.20 numero 4,pp.211-215.

Haapasalo M, Ranta H, Shah H. ,(1986) "Black-pigmented *Bacteroides spp* in human apical periodontitis" en *Infect Immun*; Vol.53, pp.149-53.

Hashioka, K.; Yamasaki, M.; Nakane, A.; Horiba, N. y H. Nakamura. (1992) "The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals" en *Journal of Endodontics* Vol 18 numero 11, pp.558-61.

Heimdahl, A.; Von Konow, L.; Satoh, T. y CE. Nord, (1985) "Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings" en *Journal of Clinical Microbiology* Vol.22, pp.299-302.

Jung IY., Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. (2000) "Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection" en *Journal of Endodontics.*; Vol 26 numero 10 pp.599-604.

Kantz WE y Henry CA., (1974) "Isolation and clasification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man" en *Archs Oral Biol*; 1: 91-9.

Kakehashi, S.; Stanley, H. y R. Fitzgerald. (1965) "The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats" en *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Endodontics* Vol.20, pp.340-9.

Lana, M.; Ribeiro-Sobrinho, A.; Stehling, R.; Garcia, G.; Silva, B.; Hamdan, J.; Nicoli, J.; Carvalho, M. y L. Farias. (2001) "Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro" en *Oral Microbiology and Immunology* Vol.16 numero 2, pp.100-5.

Lin, L.; Skribner, J. y P. Gaengler, (1992) "Factors associated with endodontic treatment failures" en *Journal of Endodontics* 18, pp.625-627.

Molander, A.; Reit, C.; Dahlen, G. y T. Kvist. (1998) "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis" en *International Endodontic Journal* 31(1), pp.1-7.

Monbelli, A.; Mc Nabb, H. y N. Lang, (1991) "Black pigmented Gram-negative bacteria in Periodontal disease. Topographic distribution in the human dentition" en *Journal of Periodontics* Vol 26, pp.301-307.

Mondragón, JD. (1995) *Endodoncia*. 1ª ed.; Interamericana-Mc Graw Hill. pp 34.

Moromi NK. Bacterias orales y enfermedades sistémicas: una revisión. *Odontol Sanmarquina*. 2004; 8(1):30-34.

Peters, LB.; Wesselink, PR. y AJ. van Winkelhoff ,(2002) "Combinations of bacterial species in endodontic infections" en *International Endodontic Journal* Vol.35 numero 8,pp.698-702.

Perea, EJ. (2004) "La flora de la boca en la era de la biología molecular" *Oral Patol Oral Cir Bucal*, 9:1-10

Rolph, HJ.; Lennon, A.; Riggio, MP.; Saunders, P.; Mackenzie, D.; Coldero, L. y J. Bagg ,(2001) "Molecular Identification of Microorganisms from Endodontic Infections" en *Journal of Clinical Microbiology* Vol.39 numero 9,pp.3282-3289.

Rogério, CJ.; Montagner, F.; Signoretti, FG.; Almeida, GC. y B.Gomez, (2008) "Frequency, Microbial Interactions, and Antimicrobial Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* Isolated from Primary Endodontic Infections" en *Journal of Endodontics* Vol.34 numero 12, pp.1451-1456.

Saito D, de Toledo LR, Mazza RJL, Tsai SM, Höfling JF, and Gonçalves RB. (2006) "Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries" en *Journal Med Microbiol* Vol.55 pp.101-107.

Silva, BL.; Nelson,FP.; Faria, G.; Souza, SM. y IY. Ito, (2006) "Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions" en *Brazilian Dental Journal* Vol.17 numero 2,pp.144-148.

Siqueira JF, De Uzeda M, Varejao E., (1995) "Sintomatologia clinica persistente devido a infeccion endodontica por *Fisobacterium nucleatum*" en *Rev. Gaucha Odontol* Vol.43, pp. 149-52.

Siqueira, J.; Rocas, I.; Alves, F. y K. Santos, (2004) "Selected Endodontic Pathogens in the Apical Third of Infected Root Canals: A Molecular Investigation" en *Journal of Endodontics* Vol.30 numero 9,pp. 638-643.

Siqueira, J.; Rocas, I.; Souto, R.; Uzeda, M. y A. Colombo, (2000) "Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections" en *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* Vol.89,pp.744-8.

Siqueira, JF. y IN. Rocas, (2004)"Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment" en *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* Vol.97, pp.-94.

Sjogren, U.; Figdor, D.; Persson, S. y G. Sundqvist, (1997) "Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis" en *International Endodontics Journal* Vol.30 numero 5,pp.297-306.

Sundqvist G., (1976) Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Thesis, Umeå: Umeå University, Odontological Dissertation. pp. 1-94.

Sundqvist, G.; Johansson, E. y U. Sjogren, (1989) "Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections" en *Journal of Endodontics* Vol.15 numero 1,pp.13-19.

Sundqvist, G., (1992) "Associations between microbial species in dental root canal infections" en *Oral Microbiology and Immunology* Vol.7,pp.257-262.

Sundqvist, G., (1992) "Ecology of the root canal flora" en *Journal of Endodontics* Vol.18 número 9, pp. 427-430.

Sundqvist G., (1994)"Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora" en *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* Vol 78, pp. 522-30.

VII. ANEXOS

Anexo 1. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Nombre de la variable	Definición	Indicador	Tipo por medición	Escala	Uso	Fuente
Presencia de <i>F.nucleatum</i>	Microorganismo anaeróbico gram negativo, presente en infecciones endodénticas primarias.	No	Cuantitativa	Nominal	Determinar presencia de <i>F.nucleatum</i>	Investigación: Identificación molecular de <i>Fusobacterium nucleatum</i> en pacientes con periodontitis aguda crónica del Posgrado de Endodencia de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Anexo 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Identificación molecular de *Fusobacterium nucleatum* en pacientes con periodontitis apical crónica del Posgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Investigador Responsable: Gabriel Alvarado Cárdenas

A quien corresponda:

Por este medio, hago constar que he sido cabalmente informado (a) y doy mi consentimiento para que se me realice una muestra bacteriana endodóntica, así como tomas radiográficas periapicales.

Se me ha informado que al participar en esta investigación, no existe riesgo para mi salud ni mi integridad física.

El resultado de los datos obtenidos, radiografías y fotografías que se tomen, podrán ser utilizadas para los fines que la investigación del C. D. Gabriel Alvarado Cárdenas requiera para su estudio y publicación.

Firma de consentimiento

Paciente

Testigo

Mérida, Yucatán, México _____ de _____ de 20__.

Anexo 3

Fotografía 1. Colocación de la muestra amplificada para la electroforesis en gel de agarosa al 1%



(Laboratorio de Microbiología Oral y Biología Molecular. FOUADY)

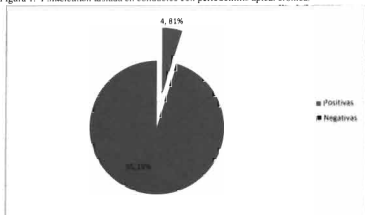
Fotografía 2. Cepa de referencia ATCC 25586 de *Fusobacterium nucleatum*



(Laboratorio de Microbiología Oral y Biología Molecular. FOUADY)

Anexo 4

Figura 1. *F.nucleatum* aislada en conductos con periodontitis apical crónica.



Fuente: Trabajo de investigación: Identificación molecular de *Fusobacterium nucleatum* en pacientes con periodontitis apical crónica del Posgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN



SISTEMA DE BIBLIOTECAS