



Caracterización del biofilm en el tercio apical de órganos dentarios extraídos por enfermedad periodontal

Sara María Nava Huerta,* Joselin Dennise Narváez Domínguez,* Ana María González Amaro,** Antonio Aragón Piña,*** Cuauhtémoc Araujo Andrade,**** Jorge Arturo Zermeño Ibarra*****

RESUMEN

Antecedentes: Los microorganismos presentes en la cavidad oral no se encuentran en forma planctónica, sino en comunidades denominadas biofilm, las cuales ofrecen resistencia a los antimicrobianos. El biofilm puede presentarse en diversas zonas donde se localice una infección de la pieza dental; en la pulpa y el periodonto, en virtud del foramen apical, es posible que ocurran intercambios de agentes nocivos. Resulta de interés el conocimiento de las interacciones microbianas de enfermedades periodontales en relación con las del sistema de conductos y el posible vínculo con la presencia de biofilm. **Objetivo:** Identificar y caracterizar los microorganismos en forma de biofilm en la parte apical de órganos dentarios extraídos por enfermedad periodontal, por técnicas microbiológicas convencionales, microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia Raman. **Material y métodos:** Se extrajeron un total de 20 dientes con movilidad de tercer grado y sin soporte óseo radiográfico en la Clínica de Periodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP, previa firma de carta de consentimiento informado. Se realizaron cortes longitudinales del tercio apical y se dividieron en dos grupos: 1) pared cementaria extrarradicular y 2) parte intraconducto. Se realizaron las identificaciones microbiológicas por pruebas convencionales. Las muestras se procesaron para observación del biofilm por microscopía electrónica de barrido. Se realizó el análisis de la composición química por espectroscopia Raman. **Conclusiones:** Se observó la presencia de biofilm tanto en la parte extrarradicular como en la parte intraconducto de las piezas. Se encontró una relación entre los microorganismos identificados de ambos cortes. Se identificaron los componentes químicos mayoritarios del biofilm mediante espectroscopia vibracional.

Palabras clave: biofilm, enfermedad periodontal, microscopía electrónica de barrido, espectroscopia vibracional, Raman.

ABSTRACT

Background: Microorganisms present in the oral cavity are not usually found in planktonic form, but in communities called biofilm, which offer great resistance against antimicrobial agents. Biofilm can be present in several areas of a tooth where an infection is found, and if such infection reaches the pulp or the periodontal tissues, it is possible that an exchange of toxic agents could take place. The bacterial interactions present in the periodontal disease and their relation with the root canal system are of great concern, as well as to match them with the presence of biofilm. **Objectives:** The aim of this study was to identify and categorize the microorganisms present in the biofilm formed on the apical third of teeth extracted due to periodontal disease by using conventional microbiological techniques, scanning electron microscopy (SEM) and Raman spectroscopy. **Material and methods:** A total of 20 teeth previously diagnosed with periodontal disease and mobility class III were extracted. The informed consent was previously signed at the Periodontal Department of the Dental School at Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Samples of the apical third were sliced longitudinally and divided into two groups: 1) extraradicular analysis; 2) root canal system analysis. Raman spectroscopy was also performed. **Conclusions:** Presence of biofilm was observed both within and outside the root canal samples. A match was observed in the microorganisms present in group 1 compared to group 2. Main chemical composition was determined by vibrational spectroscopy.

Key words: biofilm, periodontal disease, scanning electron microscopy, vibrational spectroscopy, Raman.

* Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

** Profesora-Investigadora de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

*** Profesor-Investigador del Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

**** Profesor-Investigador de la Unidad Académica de Física de la Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

***** Coordinador del Departamento de Periodoncia y Profesor-Investigador de la Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se sabe que muchas enfermedades dentales cursan con la presencia de un biofilm donde los microorganismos interactúan cooperativa o competitivamente entre sí. Se define como *biofilm microbiano* a una comunidad de microorganismos embebidos en una matriz de exopolímeros que se adhieren a una superficie húmeda; es la forma más común de organización por parte de los microorga-

nismos y les confiere tanto beneficios como protección. La baja difusión de sustancias antimicrobianas tales como irrigantes y antibióticos se debe a la presencia de la matriz polimérica, que proporciona resistencia de 10 hasta 1,500 veces más que en forma planctónica.^{1,2} La matriz polimérica también facilita el procesamiento e ingestión de nutrientes, elimina productos metabólicos potencialmente dañinos y ayuda al desarrollo de un ambiente físico-químico apropiado.³⁻⁶ Una de las patologías orales más comunes es la periodontitis, una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar.^{7,8} El periodonto y la pulpa dental están en íntima relación; anatómicamente, el periodonto está interrelacionado con la pulpa dental en virtud del foramen apical y los conductos laterales, que crean vías para el intercambio de agentes nocivos entre los dos compartimentos de tejido cuando una de las superficies o ambas se encuentran dañadas.^{4,5,9} Anteriormente se creía que el sistema de conductos radiculares y túbulos dentinarios albergaba microorganismos infecciosos, mientras que el área extrarradicular se creía libre de bacterias; sin embargo, existe evidencia reciente de presencia bacteriana en áreas extrarradiculares en lesiones periapicales. Estudios que emplearon microscopia electrónica de barrido indican que las bacterias pueden formar una estructura de biofilm, invadiendo el área extrarradicular del conducto y del foramen apical, y adherirse a la superficie del cemento de 2 a 3 mm alrededor del ápice.¹⁰

Hoy en día existen diversos métodos para determinar la composición química de los biofilms; uno de ellos es la espectroscopia Raman, que es una espectroscopia vibracional basada en la dispersión inelástica de fotones por moléculas; permite obtener información química muy específica de los materiales de una forma no destructiva, ya que no se requiere de una preparación especial de la muestra, con la posibilidad de realizar mediciones *in vivo* e *in situ*. Asimismo, puede ser empleada para mediciones cualitativas y cuantitativas. En las últimas décadas, se ha utilizado en el estudio de los tejidos dentales duros y ha sido vista como una técnica con gran potencial en el área del diagnóstico médico, microbiológico y en alimentos. Estudios recientes han hecho posible la identificación de los componentes minerales presentes en el cálculo dental y dentina.^{7,11}

OBJETIVO

Identificar y caracterizar los microorganismos en forma de biofilm en la parte apical de órganos dentarios extraídos por enfermedad periodontal, por técnicas microbiológicas convencionales, microscopia electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia Raman.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del estudio fue descriptivo, observacional, *in vitro*; las muestras se obtuvieron de pacientes que acudieron a la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Estomatología, UASLP, San Luis Potosí, México. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la misma dependencia y se dividió en cuatro fases: 1) clínica, 2) microbiológica, 3) microscopia electrónica de barrido y 4) espectroscópica.

1. Fase clínica. Se seleccionaron para el estudio 20 pacientes (13 hombres y 7 mujeres) de entre 24 y 83 años de edad. *Criterios de inclusión:* sujetos con diagnóstico de enfermedad periodontal severa generalizada o localizada en el segmento anterosuperior o anteroinferior, individuos sistémicamente sanos o controlados, órganos dentarios (OD) con movilidad grado 3, OD que radiográficamente mostraron soporte óseo escaso, OD unirradiculares, y pacientes que accedieron a firmar el consentimiento informado. *Criterios de exclusión:* OD con lesión cariosa o exposición pulpar, con tratamiento de conductos, con restauraciones extensas o prótesis fija, o que presentaran fracturas radiculares. *Obtención de la porción radicular.* Se realizó la extracción de los órganos dentarios previo uso de colutorios con clorhexidina al 0.12% durante un minuto, utilizando sólo el fórceps correspondiente, sin manipular la porción radicular. Una vez extraídos, se enjuagaron dos veces con solución salina estéril y se procedió a realizar tres cortes longitudinales en los 3 mm apicales de cada órgano dentario con discos de carburo (Dentorium, USA) estériles de 0.22 mm de grosor por la precisión de sus cortes, montados en una pieza de mano de baja velocidad (DENTSCLER, Sao Paulo, Brasil), sin irrigación. Se obtuvieron un total de 44 muestras (N = 44), distribuidas en tres grupos: grupo 1: 20 (pared cementaria), grupo 2: 20 (pared del conducto radicular) y grupo 3: 4 (cortes para caracterización mediante espectroscopia Raman), como se muestra en la figura 1.

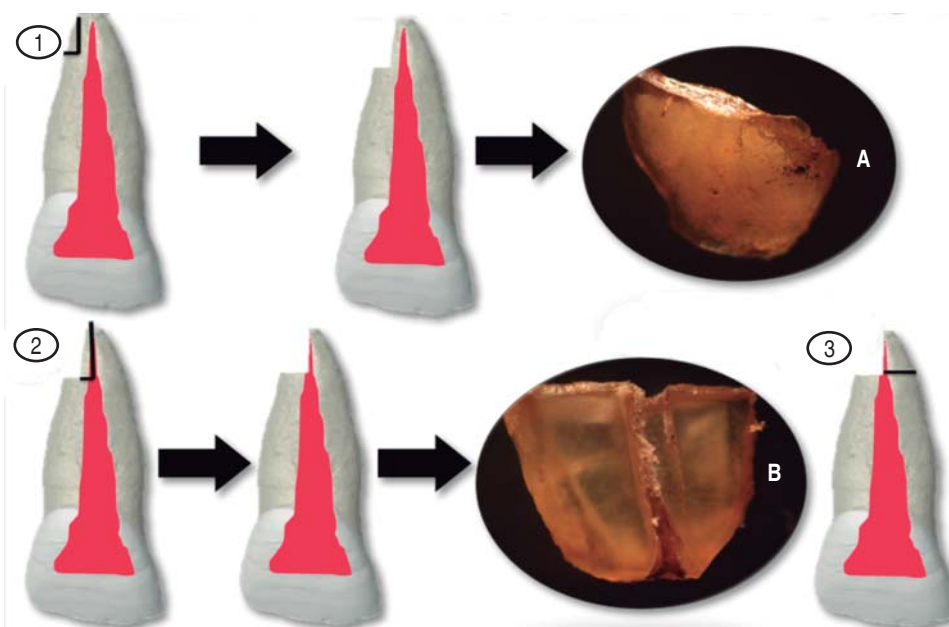


Figura 1. Esquema que representa el procedimiento llevado a cabo para la obtención de los cortes. 1. Se realiza una sección con el disco de carburo paralela al eje longitudinal del diente, abarcando los 3 mm apicales de la raíz y evadiendo el conducto radicular, seguida por una sección perpendicular al eje longitudinal para obtener un corte como el que se muestra en A (grupo 1). 2. Para la obtención del segundo corte, se realiza la misma acción con el fin de exponer el conducto radicular, como se muestra en B (grupo 2). 3. La porción apical restante se obtiene con un corte transversal al eje longitudinal del diente, corte que sería destinado para su análisis con espectroscopia vibracional.

2. Fase microbiológica: aislamiento e identificación de microorganismos. Una vez obtenidos los cortes cementario y radicular (grupo 1 y grupo 2), cada uno se colocó en medio de cultivo de tioglicolato prerreducido (BD-BBL, Becton Dickinson de México, SA de CV) y se llevaron al laboratorio para su procesamiento en un ambiente de anaerobiosis 85% N₂, 10% H₂ y 5% CO₂, (Coy Laboratory Products Inc., Modelo 2002 Michigan, EUA) a 36 °C + 2 durante 48 horas o hasta observar turbidez. Posteriormente a este tiempo, los cortes se enjuagaron con solución *buffer* para su preparación y observación al microscopio electrónico de barrido. Se realizó un inóculo en placas de agar sangre CDC (BD-BBL, Becton Dickinson de México, SA de CV) de cada uno de los tubos que presentaron desarrollo y se incubaron durante 48-72 horas. Después de este tiempo, se observó morfología macroscópica y microscópica de los cultivos con el fin de obtener cultivo puro para su identificación por medio de características de tinción, presencia de esporas y, finalmente, el perfil bioquímico, a través de las pruebas de identificación

API 20 Strep y API 20A (Analytical Profile Index; Biomeriëux®, Francia).

3. Fase observacional al microscopio electrónico de barrido: Los cortes, después de haber sido enjuagados con solución *buffer*, se fijaron en glutaraldehído al 2% (SIGMA-ALDRICH grado 1 al 25%) y azul de alciano (HYCEL de México, SA de CV) al 1% durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se deshidrataron con alcoholes crecientes al 20, 40, 60, 80, 90 y 96% (Tecnología Industrial Química, SA de CV, México) durante 10 minutos en cada serie para proceder a realizar el secado a punto crítico (Critical Point Dryer 020 Balzers Union, LEICA EMCOD030). Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro mediante bombardeo iónico (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100) para su lectura al microscopio electrónico de barrido (Philips XL 30, EUA), observándose varias áreas de la muestra en magnificaciones desde 63x hasta 10,000x.

4. Caracterización por espectroscopia Raman. Los espectros Raman se obtuvieron en forma aleatoria en un microscopio (Leica DMLM)

integrado a un sistema micro-Raman (Renishaw, modelo 1000B), de diversas zonas para obtener la mayor información sobre la composición química del biofilm y su homogeneidad. El sistema micro-Raman fue calibrado usando un fonón de primer orden del silicio en 520 cm^{-1} . La longitud de onda del láser de excitación fue de 830 nm (cercano infrarrojo), utilizando el objetivo 40X. La potencia del láser sobre la muestra fue de 45 mW , con un tiempo de exposición de 30 segundos. Un promedio de 30 espectros fueron tomados para cada una de las muestras en un rango espectral de los $1,800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Los espectros obtenidos fueron corregidos en su línea base, para compararlos finalmente con la base de datos.

RESULTADOS

Resultados microbiológicos

En cuanto a las identificaciones de los microorganismos, en el corte de la parte cementaria (grupo 1) se encontraron un total de 11 géneros y 19 especies; los que mostraron mayor incidencia fueron *Aerococcus viridans* 2 (36.8%), *A. urinae* (26.3%), *Listeria* spp. (26.3%), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (10.5%), y otros en menor proporción (Figura 2).

En la zona del conducto radicular (grupo 2), fueron identificados un total de 13 géneros y 24 especies; los que mostraron mayor incidencia fueron *A. viridans* 2 (37.5%), *A. urinae* (20.8%), *Lactococcus lactis* spp. *Cremoris*, *S. sanguis* (8.3%), y otros en

menor proporción, como *S. anginosus*, *S. constellatus*, *A. naeslundii* (4.1%), entre otros (Figura 3).

De las 34 especies identificadas tanto en la zona cementaria (grupo 1) como en la radicular (grupo 2), se presentaron 10 diferentes especies en ambas zonas, resaltando la presencia de *Aerococcus viridans* 1, 2, 3, *Aerococcus urinae*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium mortiferum*, *Eggerthella lenta*, entre otras.

Del total de las muestras observadas al microscopio electrónico de barrido, se apreciaron estructuras que denotaban *biofilms* en diversas fases de maduración. De las muestras analizadas por espectroscopia, se encontraron celulosa y amilosa como componentes químicos mayoritarios.

Resultados de la fase observacional a la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (Figuras 4, 5 y 6).

Resultados de la fase espectroscópica. Los componentes químicos mayoritarios identificados en las muestras analizadas fueron celulosa, amilosa, alginato y xantano, cuyos espectros son apreciables en la figura 7.

DISCUSIÓN

La microbiología de la enfermedad periodontal ha sido el centro de investigación por décadas, ya que es la causa principal de la pérdida de órganos dentarios en adultos a nivel mundial.¹² El diagnóstico clínico

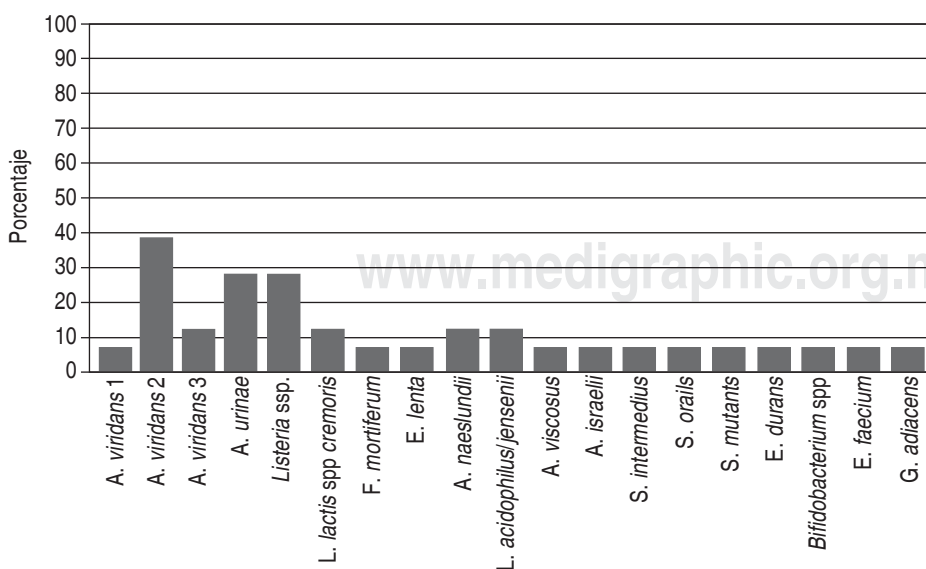


Figura 2.

Prevalencia de microorganismos en la porción apical de dientes extraídos de pacientes con enfermedad periodontal movilidad grado III identificados en la parte cementaria (grupo 1).

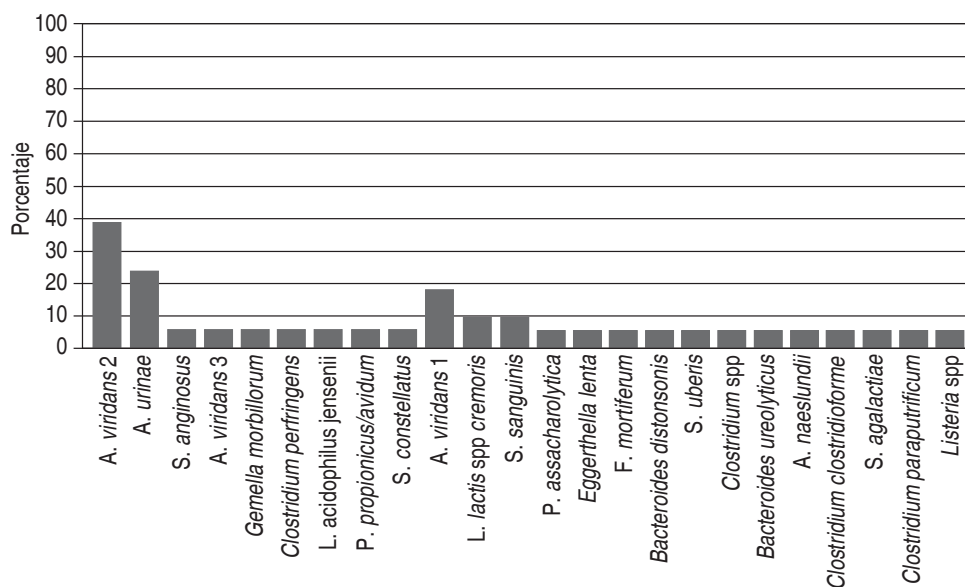


Figura 3.

Prevalencia de microorganismos en la porción apical de dientes extraídos de pacientes con enfermedad periodontal movilidad grado III identificados en la parte radicular (grupo 2).

actualmente se apoya en estudios de laboratorio para detección y cuantificación de posibles microorganismos periodontopatógenos con el fin de monitorear su prevalencia. Por otra parte, la persistencia de microorganismos dentro de los tubulillos dentinarios en la zona radicular ha sido descrita por varios autores como Love (2004) y Viera (2012).¹³ También se ha reportado evidencia de éstos dentro del área extrarradicular apical y lesiones periapicales en un rango de 2 a 3 mm.^{10,14-17}

Se ha observado que hay una relación entre el periodonto y el sistema de conductos, la cual fue descrita por primera vez por Simiring y Goldberg en 1964, cuya relevancia clínica radica en que los tejidos periodontales mantienen una íntima relación a través del foramen apical, donde puede establecerse intercambio de microorganismos en conjunto con sus toxinas; por lo tanto, las cargas bacterianas en un tejido pueden afectar al otro. La cantidad de destrucción de tejido se correlaciona directamente con el contenido microbiano total en el conducto radicular y es directamente proporcional al tiempo que estos tejidos están expuestos a los microorganismos.⁴

Para poder relacionar la microbiota de la parte extrarradicular y la parte intraconducto en su porción apical, se han descrito varias técnicas. En 2008, Rocha y colaboradores realizaron un estudio con el objetivo de evaluar mediante microscopia electrónica de barrido la presencia de biofilms en las superficies externas del tercio apical de dientes

primarios humanos con pulpas vitales o necróticas con o sin evidencia radiográfica de patología perirradicular. Para llevar a cabo este estudio, las muestras fueron divididas en tres grupos distintos: grupo 1: dientes con pulpa normal, grupo 2: dientes con necrosis pulpar sin patología periapical radiográficamente visible, y grupo 3: dientes con necrosis pulpar y patología periapical radiográficamente visible bien definida. Después de almacenar estas muestras en distintas soluciones, se enjuagaron con solución salina estéril y se seccionaron usando un disco de carburo montado en una pieza de mano de baja velocidad; se realizó una pequeña hendidura perpendicular al eje de la raíz a 3 mm de distancia del ápice radicular. Esta hendidura sirvió como una guía para la colocación de un cincel quirúrgico que se usó junto con un martillo quirúrgico para cortar la porción apical del diente.¹⁸ Vier-Pelisser y su equipo realizaron en 2013 un estudio para correlacionar los hallazgos radiográficos y las imágenes obtenidas al MEB de la resorción apical externa en dientes con lesiones periapicales. Se extrajeron 45 dientes humanos no restaurables debido a la gran destrucción coronal del diente. La metodología que siguieron para la sección de las muestras fue similar al estudio de Rocha y colegas. Los 3 mm apicales de cada raíz se seccionaron con discos de carburo con irrigación. Los ápices radiculares se colocaron en viales de plástico con solución de NaOCl al 2.5% por tres horas, y posteriormente se llevaría a cabo

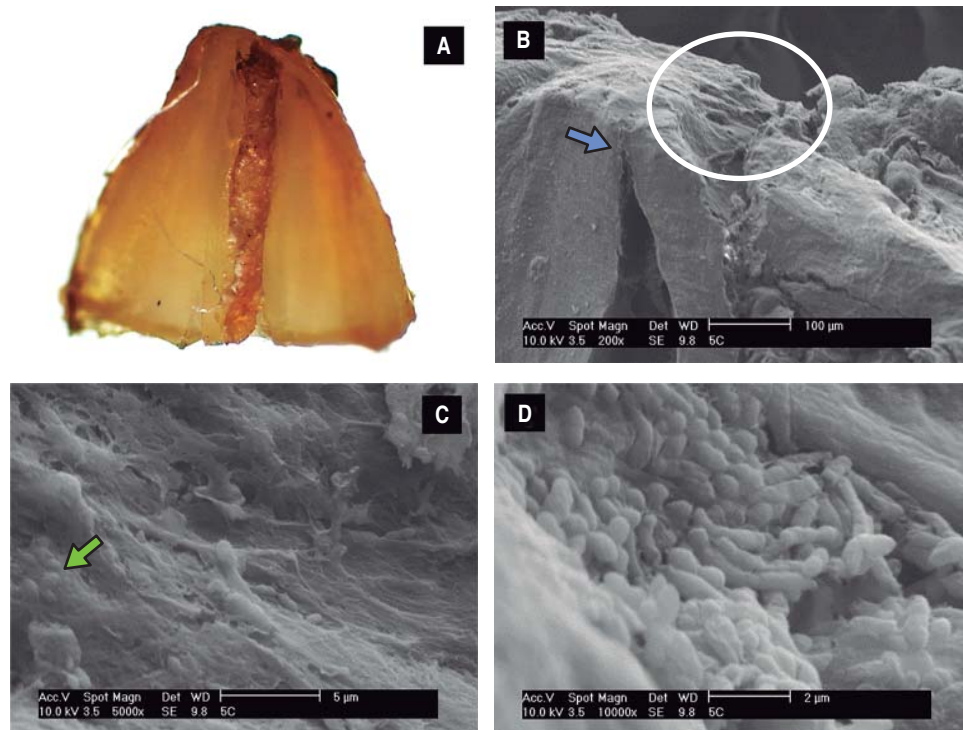


Figura 4. (A) Vista al microscopio estereoscópico de un corte correspondiente al grupo 2; los microorganismos identificados fueron *Aerococcus urinae*, *Aerococcus viridans* y *Streptococcus constellatus*. (B) Microfotografía a 200x en la que se destaca con el círculo la estrecha relación entre el conducto radicular principal y la región periodontal apical a través del foramen. La flecha indica un conducto radicular accesorio. (C) Magnificación a 5000x de la región del foramen apical en la que se aprecia un entramado de fibras de exopolisacáridos; debajo de éste, se pueden observar formas cocoides en donde señala la flecha. (D) Magnificación a 10,000x de C que muestra formas cocoides en reproducción y dispuestas en cadena cubiertos por una vaina. Se observan también múltiples canales de comunicación.

la preparación de las muestras para su observación al MEB.¹⁹ Wang y su grupo compararon la flora bacteriana y el biofilm extrarradicular asociado al segmento apical de dientes con postratamiento de periodontitis apical. Se realizó apicectomía de los pacientes con periodontitis apical; para los casos controles, se extrajeron premolares por razones ortodónticas con coronas intactas. Tres milímetros apicales de la raíz se seccionaron perpendicularmente al eje mayor del diente con un disco de diamante para pieza de baja velocidad, irrigando con gotas de agua estéril. Durante este procedimiento, las zonas apicales de la raíz estaban protegidas del contacto con los instrumentos.¹⁰

En el presente estudio se propuso un modelo de finos cortes longitudinales de los 3 mm del ápice para separar la parte intrarradicular y extrarradicular, identificar los microorganismos de cada parte de

manera individual, poder relacionar las interacciones entre ellos y llevar a cabo la caracterización de componentes químicos mayoritarios del biofilm periodontal.

En cuanto a la identificación de los microorganismos de un biofilm, existen diversas técnicas, entre las que destacan la técnica convencional de cultivo—considerada como estándar de oro, que puede detectar especies no organizadas y proporcionar cultivos para su posterior análisis—y técnicas moleculares—como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real y técnicas moleculares del gen 16S RNAr, las cuales son capaces de reconocer bacterias que no pudieron ser identificadas por otros métodos, ya que no requieren de células bacterianas, sino que basta con la presencia de fragmentos de ADN de remanentes bacterianos—.²⁰ Para realizar identificaciones de microorganismos viables como agentes causales de

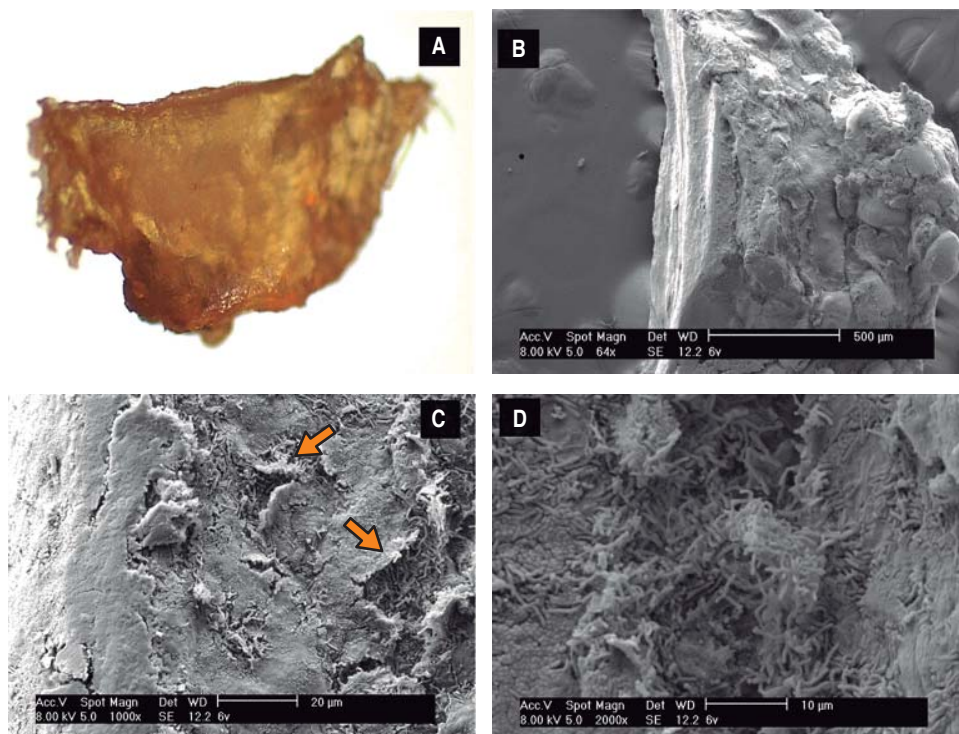


Figura 5.

(A) Vista al microscopio estereoscópico de un corte correspondiente al grupo 1; los microorganismos identificados fueron *Aerococcus viridans* y *Listeria* spp. (B) Microfotografía a 64x en la que se observa la superficie cubierta en su totalidad por conglomerados de biofilm maduro. (C) Magnificación a 1000x, las flechas indican rupturas de la superficie de biofilm maduro, de donde se desprenderán especies bacterianas para colonizar nuevas superficies (fase final de formación de biofilm). (D) Magnificación a 2000x de C que muestra con claridad especies de bacilos y cocos colonizando una misma superficie; se observan también canales de comunicación.

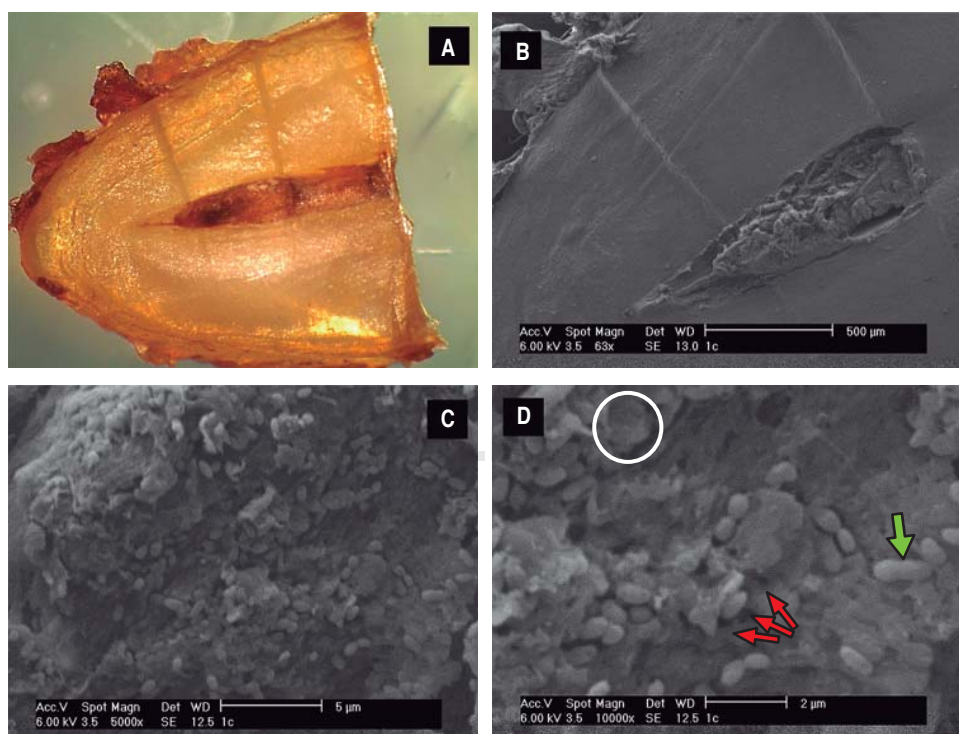


Figura 6.

(A) Vista al microscopio estereoscópico de un corte correspondiente al grupo 2, el microorganismo identificado fue *Aerococcus urinae*. (B) Microfotografía a 63x, se observa la calcificación del conducto radicular debida a la avanzada edad del paciente (83 años). (C) Magnificación a 5000x, se observan múltiples formas cocoides cubiertas en zonas por matriz de EPS. (D) Magnificación a 10,000x de C, dentro del círculo se observa la presencia de una posible levadura; la flecha de la derecha indica formas microbianas en mitosis y el grupo de las flechas (abajo al centro) indica la presencia de canales de comunicación.

las patologías presentes, existen técnicas enzimáticas como las utilizadas en 2011 por Signoretti y colaboradores en el estudio del tercio apical de una pieza dental con un tratamiento de conductos que fracasó, siendo adecuadas las identificaciones realizadas.²¹ Debido a su confiabilidad en la identificación de microorganismos viables, en la presente investigación

se emplearon técnicas enzimáticas en conjunto con la observación al MEB. Gracias a la capacidad de esta técnica para observar la ultraestructura de la pared celular y la morfología celular, se logró relacionar la morfología bacteriana con las identificaciones realizadas mediante el sistema enzimático, obteniendo resultados favorables. Los microorganismos cultivables

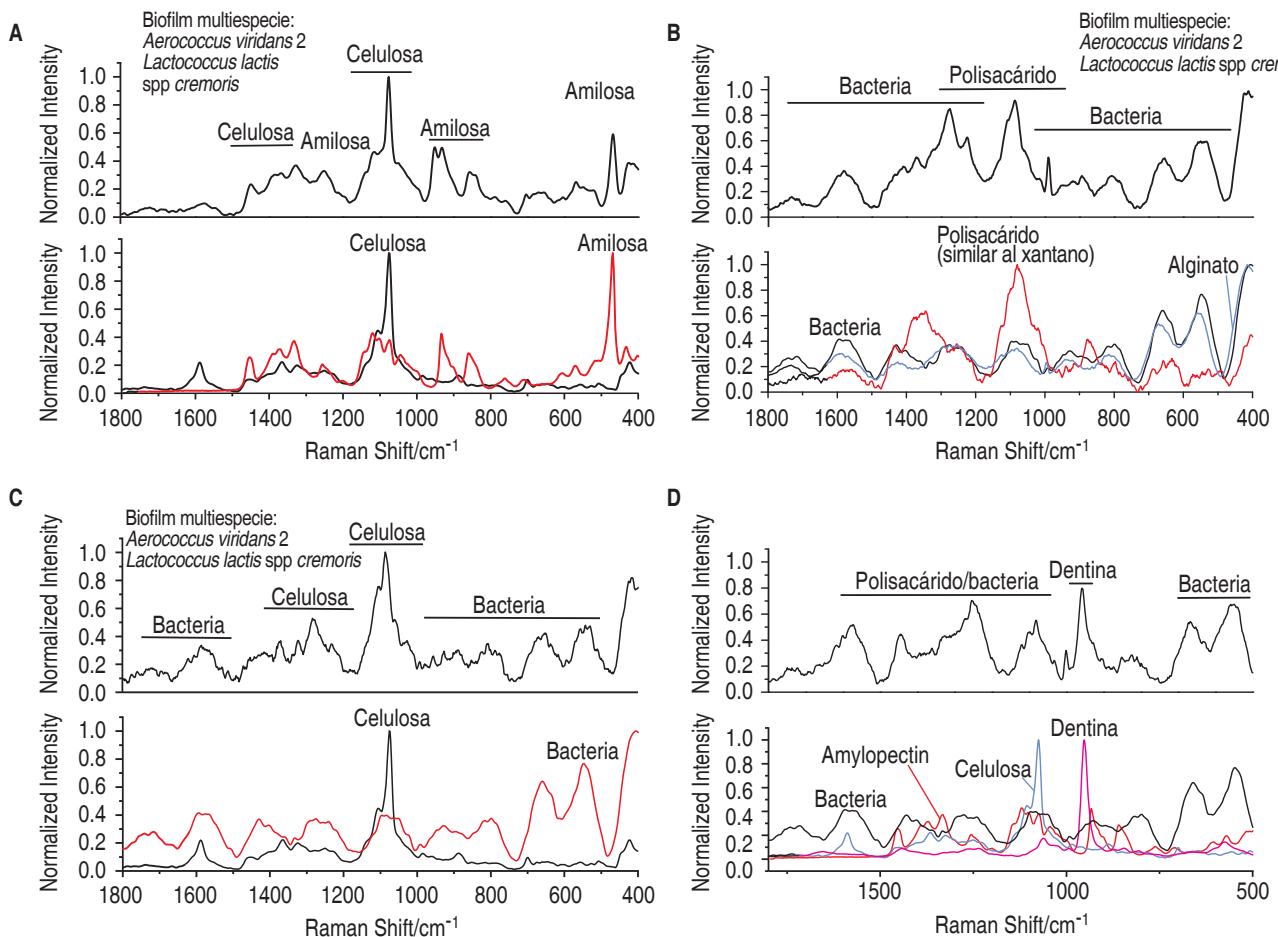


Figura 7. (A) Espectro Raman de biofilm multispecie (*Aerococcus viridans* 2 y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*) de la muestra identificada como Núm. 17 (parte superior) y espectros de referencia de celulosa y amilosa utilizados para su identificación en el biofilm 17. **(B)** Espectro Raman de biofilm multispecie (*Aerococcus viridans* 2 y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*) de la muestra identificada como Núm. 17, colectado en una zona diferente. Para este biofilm también se identificaron células bacterianas íntegras (bacterias enteras), polisacáridos con estructura similar a la del xantano y alginato. **(C)** Espectro Raman de biofilm multispecie (*Aerococcus viridans* 2 y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*) de la muestra identificada como Núm. 17. Para este mismo biofilm, como ya se mostró, la presencia de celulosa y células bacterianas íntegras es evidente, variando su proporción, así como el estado cristalino de la celulosa en la muestra de biofilm. **(D)** Espectro Raman de biofilm multispecie (*Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus/jensenii*) de la muestra identificada como Núm. 19. En el espectro Raman colectado de este biofilm, se puede identificar la presencia de polisacáridos, los cuales, por sus características espectrales, podrían ser celulosa y amilosa. Adicionalmente, se observa la presencia de dentina (sustrato) y células bacterianas.

aislados con mayor frecuencia en el presente estudio fueron *Aerococcus viridans* y *Aerococcus urinae*. Microorganismos identificados de gran importancia clínica fueron *A. naeslundii*, *A. israelii* y *A. viscosus* y los microorganismos pertenecientes al grupo *S. intermedius*: *S. constellatus*, *S. anginosus* y *S. intermedius*. *Aerococcus viridans* puede encontrarse en vías aéreas superiores y piel de sujetos sanos. Jiang y colegas presentaron en 2013 un caso de infección odontológica provocada por *Aerococcus viridans* en Japón.²² *Aerococcus urinae* es identificado como un posible patógeno colonizador del tracto urinario.²³ Aunque se considera de baja patogenicidad y podría no necesitar tratamiento, existen descripciones de algunas infecciones severas, incluyendo endocarditis, principalmente en hombres.^{24,25} De igual manera, Sunde reportó en 2002 *Aerococcus urinae* en la microbiota de lesiones periapicales refractarias.²⁶ En el año 2000, Manrique y su grupo, en su estudio para identificar las bacterias presentes en enfermedad periodontal relacionada con enfermedad renal crónica terminal, encontró entre otros a *A. urinae* en un porcentaje de 25%, lo cual sugiere que existe una relación sistémica entre ambos padecimientos.²⁷ En cuanto al grupo de actinomyces, algunas especies de *Actinomyces* spp., como *A. viscosus*, *A. israelii*, *A. naeslundii* son consideradas como microorganismos normales en la cavidad oral.^{28,29} Sin embargo, Canesi y su equipo mencionan a *A. naeslundii* asociado a la etiología de la enfermedad periodontal³⁰ y Al-Ahmad menciona a *A. naeslundii* y *A. viscosus* como principales formadores de biofilm en enfermedad periodontal moderada.³¹ Por otra parte, Flores y colaboradores demostraron que a nivel de las superficies radiculares expuestas, se hacen evidentes diversas formas de streptococos y formas bacilares propias de *A. naeslundii*. Los autores también reportaron que el mayor número de sujetos en los cuales se aisló el *Actinomyces* spp. presentaron compromiso sistémico y una higiene bucal deficiente, demostrando que son factores que facilitan la colonización de estos microorganismos en los tejidos del huésped.³² Esto concuerda con nuestro estudio, en donde la mayoría de los pacientes en los que se encontraron estos microorganismos padecen enfermedades sistémicas y deficiencia en el cepillado dental. Para *Actinomyces viscosus*, Ximenez, en un estudio que se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco en 2006, menciona que entre los agentes causales de la enfermedad periodontal que se encuentran en la

placa dental figuran los *Actinomyces* spp., (75-77.4%) en particular el *A. viscosus*, que predomina en la gingivitis.³³ El grupo de *Streptococcus milleri* (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*) es miembros de la microflora normal de la boca y la garganta.³⁴⁻³⁶ Según Peltroche-Llacsahuanga y colaboradores, *S. intermedius* se asocia frecuentemente con periodontitis crónica y abscesos de la parte superior del cuerpo, especialmente cerebrales.³⁷ Mientras que Whiley y su grupo investigaron en 1992 la distribución de las tres especies en diferentes sitios del cuerpo y demostraron una asociación de *S. intermedius* con la placa dental; Fisher & Russell lo confirmó como el más común de los estreptococos del grupo *Milleri* en la placa supragingival e identificó a *S. anginosus* con mayor frecuencia asociado con abscesos periapicales dentales.^{34,38}

Por otra parte, dentro de las técnicas de caracterización de componentes químicos, se encuentra la herramienta de espectroscopia Raman, que se ha empleado en el campo de la odontología para el estudio en los cambios minerales del cálculo dental humano, detectar la formación de fluoruro de calcio en el esmalte, estudiar características de esmalte, dentina y materiales restauradores, y recientemente, como dispositivo auxiliar en el diagnóstico de lesiones de mucosa oral y cáncer.^{11,39,40} En cuanto a identificación bacteriana, ha mostrado grandes ventajas sobre otras técnicas, reduciendo costos y tiempos. En este estudio, fue utilizada con el fin de conocer los componentes químicos mayoritarios del biofilm periodontal, arrojando como resultados los exopolisacáridos alginato, celulosa, xantano y amilosa. Garret mencionó en 2008 que el alginato, cuya producción se ha atribuido principalmente a la *Pseudomonas aeruginosa*, tiene la capacidad de formar geles viscoelásticos altamente hidratados, brindando así propiedades viscoelásticas al biofilm, además de estabilidad mecánica y resistencia a antisépticos y antibióticos.⁴¹ En cuanto a la celulosa, Gualdi y colegas refieren que este polisacárido juega un papel importante como agente protector de las bacterias embebidas en el biofilm, además de dar soporte estructural a la matriz.⁴² Ghaffoor, en 2011, sugirió que la consistencia altamente hidratada del xantano protege a las bacterias de las tensiones ambientales.⁴³ Yun y colaboradores, en 2006, afirmaron que el xantano contribuye a las bacterias en crecimiento, tiene un papel en la formación de biofilm y brinda propiedad de adherencia a las especies

colonizadoras; debido a sus puentes de hidrógeno, consta de propiedades similares a las del alginato.⁴⁴ Por último, el espectro encontrado de la amilosa tiene una enorme similitud con el espectro de la amilopectina; sin embargo, la literatura existente menciona que la mayoría de los polisacáridos del biofilm son insolubles en agua, y la amilopectina no presenta esta propiedad, por lo que nos inclinamos a que el polisacárido en cuestión es amilosa, pero no se descarta la posibilidad de presencia de amilopectina.

CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados e identificados en los ápices radiculares mostraron una organización en forma de biofilm en el total de las muestras. La carga microbiana presentó similitudes importantes en la parte del cemento y el conducto radicular, lo que demuestra la estrecha relación en la parte apical. A pesar de que los pacientes no presentaban afecciones de tipo pulpar, se encontraron un número significativo de bacterias colonizando el conducto radicular. Se determinaron los componentes químicos mayoritarios del biofilm, los cuales juegan un papel importante como agentes protectores de las bacterias, además de dar soporte estructural a la matriz y conferirle su propiedad de adherencia.

REFERENCIAS

1. Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. J Periodontol. 1980; 51: 668-669.
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134-144.
3. Gómez M, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2.ª ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2003. pp. 212-383.
4. Gopal S, Kumar KP. Interrelationship of endodontic-periodontal lesions –an overview. Indian Journal of Dental Sciences. 2011; 3 (2): 55-59.
5. Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. J Clin Periodontol. 2002; 29: 663-671.
6. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in Chilean population. J Periodontol. 2005; 76 (2): 289-294.
7. Denkhaus E, Meisen S, Telgheder U, Wingender J. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. Microchim Acta. 2007; 158: 1-27.
8. D'Ercole S, Catamo G, Piccolomini R. Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. Crit Rev Microbiol. 2008; 34: 33-41.
9. Simring M, Goldberg M. The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. Journal of Periodontology. 1964; 35: 22-48.
10. Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post treatment apical periodontitis. J Endod. 2012; 38: 954-995.
11. Tsuda H, Arends J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. Adv Dent Res. 1997; 11 (4): 539-547.
12. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. Periodontol 2000. 2013; 62: 95-162.
13. Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. J Endod. 2012; 38 (2): 250-254.
14. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. Endod Dent Traumatol. 1991; 7: 226-229.
15. Trostard L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. Endod Dent Traumatol. 1990; 6 (2): 73-77.
16. Kalfas S, Figdor D, Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radicidentis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 92: 208-214.
17. Torrungruang K, Bandhaya P, Likittanasombat K, Gritta-yaphong C. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban thai adults. J Periodontol. 2009; 80 (1): 122-129.
18. Rocha et al. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. Int Endod J. 2008; 41: 664-669.
19. Vier-Pelisser FV. Apical resorption in teeth with periapical lesions. Correlation between radiographic diagnosis and SEM examination. Aust Endod J. 2013; 39: 2-7.
20. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000. 2005; 38: 135-187.
21. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. J Endod. 2011; 37 (12): 1696-1700.
22. Jiang X, Yang S, Sun G. Odontogenic infection due to *Aerococcus viridans*: a case report. J Oral Maxillofac Surg. 2013; 71 (9): 1552-1554.
23. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. J Gen Microbiol. 1992; 138: 401-405.
24. Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL. Clinical significance of *Aerococcus urinae*: a retrospective review. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 53: 289-292.
25. Kass M, Toye B, Veinot JP. Fatal infective endocarditis due to *Aerococcus urinae* –case report and review of the literature. Cardiovasc Pathol. 2008; 17: 410-412.
26. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod. 2002; 28 (4): 304-310.

27. Manrique de Bellard E, Stanys May H. Microorganismos identificados en el tejido periodontal en pacientes con enfermedad renal crónica terminal. Gac Med Caracas. 2000; 108 (3): 518-524.
28. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR et al. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. Microbiology. 2009; 155: 2116-2126.
29. Sullivan DC, Chapman SW. Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis/nocardia. Proc Am Thorac Soc. 2010; 7: 216-221.
30. Canesi L, Borghi C, Stauder M, Lingström P, Papetti A, Pratten J et al. Effects of fruit and vegetable low molecular mass fractions on gene expression in gingival cells challenged with *Prevotella intermedia* and *Actinomyces naeslundii*. J Biomed Biotechnol. 2011; 2011: 230630.
31. Al-Ahamad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. J Endod. 2014; 40 (2): 223-230.
32. Flores L, Do T, Gilbert SC, Cox S, Clark D, Wickström C et al. Application of MLST and pilus gene sequence comparisons to investigate the population structures of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*. PloS One. 2011; 6 (6): e21430.
33. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2006; 33: 869-877.
34. Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. J Clin Microbiol. 1992; 30: 243-244.
35. Yamamoto M, Fukushima T, Ohshiro S et al. Brain abscess caused by *Streptococcus intermedius*: two case reports. Surg Neurol. 1999; 51: 219-222.
36. Vajramani GV, Akrawi H, Jones G, Sparrow CE. Primary ventriculitis caused by *Streptococcus intermedius*. Br J Neurosurg. 2007; 21 (3): 293-296.
37. Peltroche-Llacsahuanga H, Reichhart E, Schmitt W, Luticken R, Haase G. Investigation of infectious organisms causing pericoronitis of the mandibular third molar. J Oral Maxillofac Surg. 2000; 58: 611-616.
38. Fisher LE, Russell RR. The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. J Dent Res. 1993; 72: 1191-1193.
39. Tsuda H, Arends J. Raman spectra of human dental calculus. J Dent Res. 1993; 72 (12): 1609-1613.
40. Howell SC, Haffajee AD, Pagonis TC, Guze KA. Laser raman spectroscopy as a potential chair-side microbiological diagnostic device. J Endod. 2011; 37 (7): 968-972.
41. Garret TR, Bhahoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science. 2008; 18: 1049-1056.
42. Gualdi L, Tagliabue L, Bertagnoli S, Ierano T, De Castro C, Landini P. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. Microbiology. 2008; 154: 2017-2024.
43. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol. 2011; 77 (15): 5238-5246.
44. Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, González-Lamothe R, Marano MR et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. Plant Physiol. 2006; 141: 178-187.

Correspondencia:

ME Sara María Nava Huerta
 Facultad de Estomatología, Universidad
 Autónoma de San Luis Potosí, México
 Tel.: (044) 44 45 82 43 41
 E-mail: saranava18@gmail.com