



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE BIOFILM MONOESPECIE POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL Y MEB PROVENIENTE DE CIRUGÍAS ENDODÓNTICAS CON DIAGNÓSTICO DE PERIODONTITIS CRÓNICA PERSISTENTE

Evelin Gómez^a, Daniel Silva Herzog^a, C. Cuauhtémoc Araujo^b, Antonio Aragón^c, Ana María González^a

^aFacultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, UASLP, México. Evelin_26@hotmail.com
dsilva_herzog@yahoo.com anamara75@hotmail.com

^bUnidad Académica de Física UAZ, México.

Caraujo123@yahoo.com

^cInstituto de Metalurgia, Facultad de ingeniería, UASLP, México
aragon@uaslp.mx

RESUMEN

Introducción. La permanencia o reactivación de los microorganismos persistentes y organizados en forma de biofilms en tratamientos endodónticos tanto multiespecie como mono especie torna compleja su erradicación, de lo cual parten las tendencias actuales a caracterizar dichas biofilms tanto en su morfología como en composición química. La aplicación de técnicas no destructivas para el estudio del biofilm como lo es la espectroscopia es de importancia para el conocimiento de uno de los motivos de fracasos de tratamientos endodónticos, lo cual deriva en la búsqueda de alternativas en su tratamiento. **Objetivo:** Determinar los componentes químicos y la morfología estructural del biofilm mono especie por espectroscopia vibracional y microscopía electrónica de barrido provenientes de cirugías endodónticas de pacientes con diagnóstico de periodontitis apical crónica persistente. **Metodología:** 10 pacientes con diagnóstico de periodontitis apical se sometieron a cirugía endodóntica removiendo los últimos 3 mm apicales de la raíz y se colocaron en medio pre-reducido para el cultivo, aislamiento e identificación de microorganismos presentes en las muestras. Se seccionó el tercio apical longitudinalmente para visualización morfológica del biofilm mono especie en una sección A y para la caracterización por espectroscopia vibracional (Raman) en la sección B. **Resultados:** Se encontró desarrollo microbiano en el total de las muestras, presencia de biofilm mono especie en el 50% de las muestras; 60% de *Enterococcus faecalis*, 20% *Lactococcus lactis cremoris*, 20% *Aerococcus viridans*. Las observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido corroboraron la presencia de biofilm mono especie. Se encontró la presencia de celulosa, ácidos grasos, bacterias como componentes mayoritarios. **Conclusiones:** Se logró una caracterización morfológica y de componentes mayoritarios en biofilm mono especie obtenido de las cirugías endodónticas apicales. La espectroscopia como herramienta de trabajo resulto ser útil y confiable en el área endodóntica de salud bucal. **Perspectivas:** ampliar los datos obtenidos de los diversos componentes de biofilms periapicales tanto mono especie como multiespecie.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

TEORÍA

BIOFILM El biofilm según Costerton, es una comunidad de microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos que se adhieren a una superficie húmeda, mientras que los organismos planctónicos, son células microbianas que se encuentran flotando libremente en un medio ambiente acuoso.¹

La primera descripción del biofilm fue dada por Arthur T. Henrici en 1933; y menciona que la mayor parte de las bacterias no se encontraban como organismos que flotan libremente, sino que crecían sobre alguna superficie.

Nair en 1987 estudió 31 piezas dentales mediante microscopio electrónico de transmisión, de las cuales probablemente hizo la primera descripción de una biopelícula en los conductos dentinarios de piezas necróticas, mencionando un repertorio de bacterias como cocos, espiroquetas, bacilos que permanecían suspendidos en el conducto radicular además de otros conglomerados densos adheridos a las paredes del conducto y un material de tipo amorfo que aparentemente producían las bacterias y que estaba entre estas, explicado como una matriz extracelular.^{2,3}

Tronstad y cols en el 2003 mencionan que los microorganismos encontrados en la biopelícula permanecen dentro de la matriz de exopolisacáridos, proteínas y sales minerales en solución acuosa, donde producirán distintos tipos de polisacáridos; teniendo la capacidad de síntesis o bien usando los mismos en caso de requerirlos.⁴

VENTAJAS DEL BIOFILM

El biofilm es la forma más común de organización por parte de los microorganismos y es vista como una forma de distribución y adaptación bacteriana, que les confiere un sin número de beneficios mediados por el quórum sensing; como *protección* y una baja difusión de sustancias irrigantes y antibióticos, haciéndola más resistente desde 10 hasta 1500 veces más que las bacterias en su forma planctónica; por ende aumenta su capacidad de defensa, pues tiende a calcificarse gracias a una mayor cantidad de calcio/fósforo y a su vez aumenta la degradación de dentina produciendo infecciones crónicas, es reportada en casos de fracaso endodóntico. El metabolismo en la biopelícula es bajo o casi nulo por tanto la reproducción bacteriana también lo será, por lo que la necesidad de sustrato es menor, presenta también una tolerancia genética, respuesta adaptativa al estrés y contiene un grupo pequeño de células extremadamente resistentes.⁵

Se atribuye la protección a la matriz de exopolímeros donde se encuentran embebidos los microorganismos, brinda protección al ser una barrera impermeable para la difusión de sustancias antimicrobianas donde en cierto grado se disminuirá la masa de la biopelícula, pero no se erradicará en su totalidad, por que ataca a las bacterias que se encuentran en la superficie, que son propensas al contacto con las sustancias antibacterianas debido a que su ubicación se encuentran como lo serían las bacterias planctónicas, en fase de crecimiento exponencial, más las que están en la profundidad del biofilm presentan como se mencionó anteriormente, un metabolismo bajo que las mantiene en forma latente, por ende sobrevivirán más fácilmente.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

La matriz de exopolímeros tiene otra cualidad, desde el punto de vista químico es aniónica y le permite unirse a metales pesados, péptidos antimicrobianos de tipo catiónico, o aminoglucósidos por ser antibióticos cargados positivamente, a diferencia de otros que no están cargados químicamente como son los beta-lactámicos y difícilmente se unirán a la matriz de exopolímeros; sin embargo al encontrarse ausencia de oxígeno también se disminuye la efectividad de los aminoglucósidos. La tolerancia de esta biomasa que se forma sobre las superficies hacia la persistencia o difícil erradicación se encuentra en lo descrito anteriormente, ya que es en este estadio donde las bacterias tienen un menor consumo de nutrientes y oxígeno, menor actividad metabólica en consecuencia menor replicación a nivel molecular; por lo cual no tendrán la misma efectividad los antibióticos.⁶

Por último una ventaja importante del biofilm es que posee microorganismos persistentes los cuales son una pequeña porción de células nativas que tienen variantes en su fenotipo, localizadas en la profundidad de la biopelícula y tiene la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables y presentan tolerancia antibiótica.

Las células persistentes son esenciales para el biofilm, ya que al terminar un esquema antibiótico, estas células con un estado inactivo suelen reactivarse pues los antibióticos solo podrán erradicar a aquellas que estén en la superficie y no a las que estén en la base de la matriz de exopolisacáridos. Motivo por el cual un tratamiento antibiótico suele ser inefectivo.⁷

OBJETIVO: Determinar los componentes químicos y la morfología estructural del biofilm monoespecie por espectroscopia vibracional y microscopía electrónica de barrido provenientes de cirugías endodónticas de pacientes con diagnóstico de periodontitis apical crónica persistente.

PARTE EXPERIMENTAL

a) Fase Clínica

Realizada en la Clínica de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP

Tratamiento quirúrgico para la recolección de la muestra:

Al ingresar el paciente a la clínica de la Maestría en Endodoncia se realiza la historia clínica y examen intraoral así como las pruebas diagnósticas correspondientes de percusión, palpación, movilidad, radiografía preoperatoria, diagnóstico de periodontitis apical persistente y plan de tratamiento quirúrgico para la pieza dental en cuestión, cumpliendo los requisitos anteriores y siendo candidatos para cirugía endodóntica se recolectaron un total de 10 muestras, una vez realizada la apicectomía, radisectomía o hemisección se tomó el tercio apical con pinzas de curación estériles irrigando con solución salina estéril con el fin de eliminar restos de sangre o exudado que pudieran estar presentes; todo este proceso fue llevado a cabo en un rango de esterilidad dada por medio del mechero en un radio de 30 centímetros; antes de introducir la muestra al medio de transporte, la entrada del tubo de Tioglicolato fue flameada pre y post de la colocación de la muestra para garantizar esterilidad del mismo y se selló con parafilm alrededor de la tapa del tubo y por último se etiqueta con los datos del paciente, día y hora para transportarlo y procesarlo en el laboratorio.(Fig 4.1)



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

b) Fase Microbiológica de las muestras:

Se llevó a cabo en el Laboratorio multidisciplinario de Investigación de la Maestría en Endodoncia, UASLP

Las muestras recolectadas en la clínica, colocadas en un medio pre-reducido enriquecido con hemina y menadiona al 10% permite el desarrollo de los microorganismos anaerobios, las muestras se incubaron en un ambiente anaeróbico (85% de N₂, 10% CO₂, 5% H₂) por medio de cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Inc. Modelo 2002 Michigan, USA) en un periodo de tiempo de 24-72 horas a temperatura de 35²°C hasta alcanzar un desarrollo de 0.5 en escala de Mc Farland. Posterior a este tiempo y comprobar el desarrollo bacteriológico se procedió a separar el medio de cultivo del ápice dental con la finalidad de realizar la identificación de los microorganismos presentes en las muestras de la siguiente manera.

c) Fase Observacional al MEB

Se realizó en el Instituto de Metalurgia, UASLP y Laboratorio multidisciplinario de Investigación de la Maestría en Endodoncia, UASLP

Después de procesar las muestras para lecturas de muestras biológicas se visualizaron por medio del microscopio electrónico de barrido (Philips XL 30, EEUU) en magnificaciones con un rango de 120-5000X

d) Fase Espectroscópica (Grupo S2)

Llevado a cabo en el Centro de Investigaciones en Óptica, A.C (Unidad Aguascalientes)

Realizadas en la porción derecha de las muestras del tercio apical por medio del microscopio óptico Leica (DMLM) que se encuentra integrado al sistema micro-Raman de Renishaw, modelo 1000B.

a) RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Resultados provenientes de 10 casos clínicos (cultivos microbiológicos), en el que se muestra el porcentaje de microorganismos monoespecie y multiespecie e incidencia de *Enterococcus faecalis*

CASO	MICROORGANISMO	MONOESPECIE	POLIMICROBIANO
1	Multiespecie	-	1
2	<i>E. faecalis</i>	1	-
3	<i>E. faecalis</i>	1	-
4	Multiespecie	-	1
5	<i>E. faecalis</i>	1	-
6	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	-
7	Multiespecie	-	1
8	Multiespecie	-	1
9	Multiespecie	-	1
10	<i>Aerococcus viridans 2</i>	1	-
TOTAL		5	5
%		50%	50%



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

b) RESULTADOS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

Muestra No.2: Monoespecie (*E. faecalis*)

Visualizadas mediante microscopio electrónico de barrido (Philips XL 30, EE

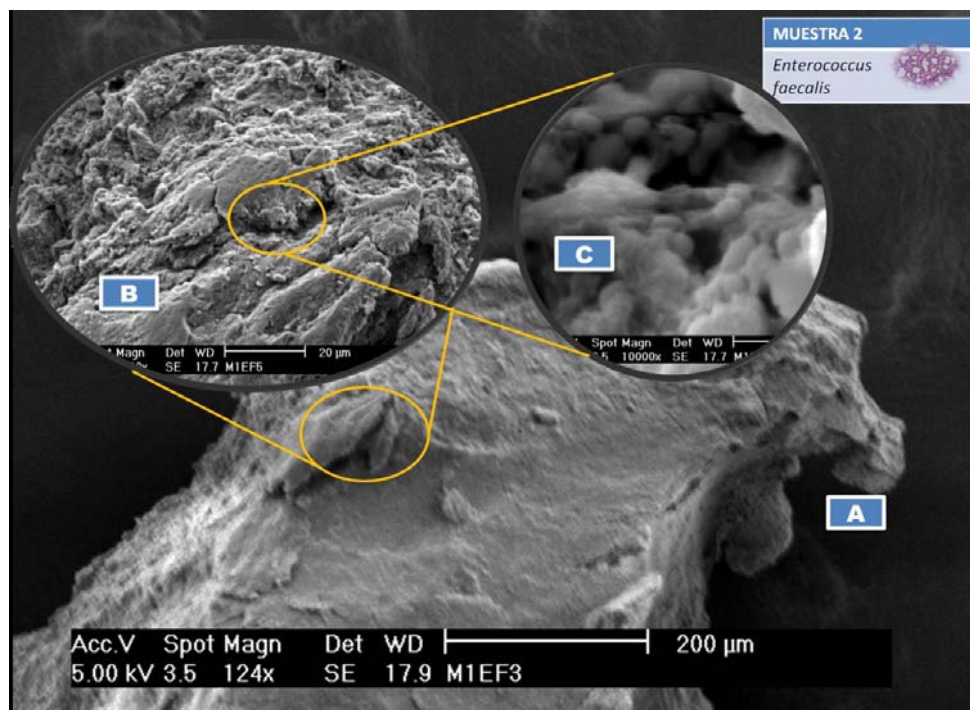


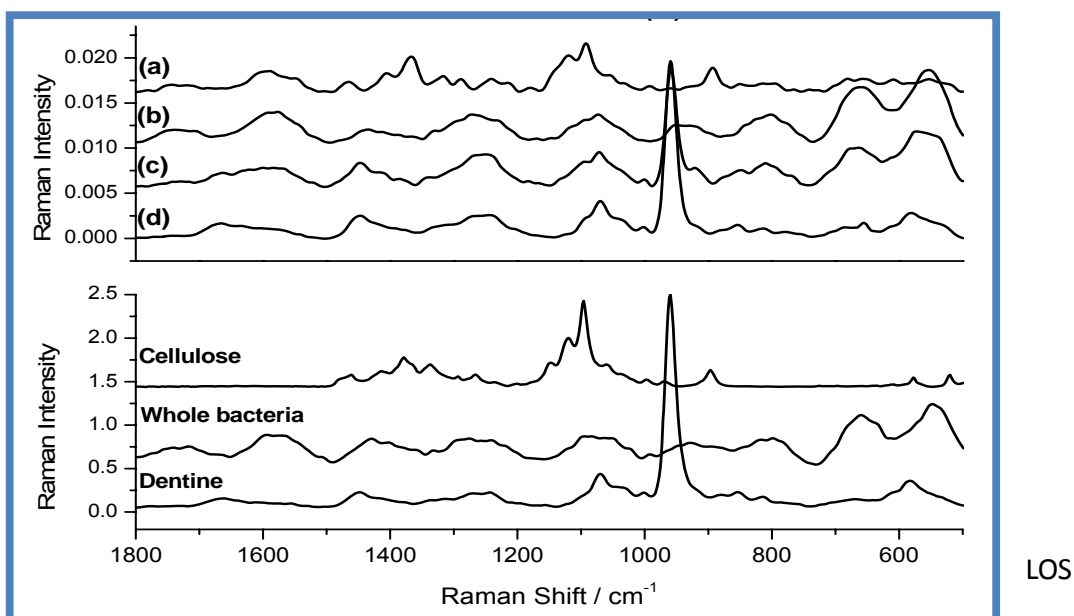
Fig.1 Tercio apical a una magnificación 124X con material extracelular amorfo sólido, (B) a 1000X donde se aprecia formas cocoides recubiertas por EPS y canales de comunicación (C) a 10000X excreción de exopolímeros por parte de los cocos presentes y embebiéndolos.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

c) RESULTADOS EN COMPONENTES QUÍMICOS



RESULTADOS OBTENIDOS FUERON PRE-PROCESADOS Y MOSTRARON LOS SIGUIENTES RESULTADOS:

En la parte superior de la Figura se observan cuatro espectros Raman correspondientes al biofilm producido por el microorganismo *Enterococcus faecalis*. En la parte inferior se muestran espectros Raman correspondientes al sustrato sobre el cual está asentado el biofilm y algunos de los componentes identificados en este biofilm, como lo son bacterias y celulosa. El espectro a) por las características espectrales que incluyen la región de los $1500-1000\text{cm}^{-1}$ permite observar bandas y picos correspondientes a **la celulosa**, donde se observan **tres bandas**, de las cuales dos son más intensas ubicadas en 1095 y 1120cm^{-1} y la otra banda de menor intensidad en 890cm^{-1} , correspondientes a modos vibracionales propios de la celulosa (vibraciones de estiramiento C-O, C-C y a vibraciones de deformación $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CCH})$ y $\delta(\text{OCH})$) (52), en el mismo espectro se encuentra un conjunto de bandas en la región de $1485-1270\text{cm}^{-1}$ que se asignan a vibraciones de deformación CH_2 y CH_2OH de la celulosa. Espectro b) muestra bandas que se asocian a bacterias embebidas o adheridas a la superficie del biofilm como se corrobora con las imágenes de la muestra No.2 de *E. faecalis* con bandas características, en la región que está por **debajo de 750**



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

cm^{-1} (región conocida como "fingerprint"), provenientes de modos vibracionales de la **amida I y III, bases nucleotídicas como la guanina y adenina**, y de grupos CH_2 y CH . El espectro **c)** contiene una combinación de bandas representativas de **dentina y bacteria**, dando una superposición de ambos componentes. Lo anterior puede ser evidenciado, observando la banda intensa a los 955 cm^{-1} asignada al modo vibracional de la hidroxiapatita $\nu_s(\text{PO}_4^{3-})$, componente principal de la dentina y las dos bandas anchas en la región del "fingerprint" asignadas a la bacteria. Finalmente el espectro **d)** nos da solo información de **la dentina** a lo largo de

BIBLIOGRAFÍA

1. Chavez de Paz L. Redefining the Persistent Infection in Root Canals : Possible Role of Biofilm Communities. *Journal of Endodontics*. 2007;33(6):652–62.
2. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*. 2004;9:27–36.
3. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of endodontics*. 1987 Jan;13(1):29–39.
4. Tronstad L, Sunde PIAT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endodontic Topics*. 2003;6:57–77.
5. Vieira AR, Siqueira F, Ricucci D. Dentinal Tubule Infection as the Cause of Recurrent Disease and Late Endodontic Treatment Failure : A Case Report. *Journal of Endodontics*. 2012;38(2):250–4
6. Pozo JL, Patel R. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;82(2)