

CARACTERIZACIÓN DE BIOFILM DENTAL MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

C.D. Adriana Jácome^a, PhD. Cuauhtémoc Araujo^b, PhD. Claudio Frausto^c, M.C. MSc.
Verónica Méndez^a, Ana María González^a

^aMaestría en Endodoncia, UASLP, adrianitajacome@hotmail.com,
vermendez@yahoo.com.mx anamara75@hotmail.com,

^bUniversidad Autónoma de Zacatecas, caraujo123@yahoo.com

^cCentro de Investigación en Óptica, Aguascalientes, Ags., cfraus@cio.mx

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los microorganismos patógenos así como su principal sustrato, los restos necróticos pulpares, pueden ser removidos por procedimientos endodónticos rutinarios que incluyen limpieza y conformación del espacio pulpar. Sin embargo, esto no se logra completamente en práctica clínica, debido a las complejidades anatómicas de este sistema. Al permanecer dichos microorganismos en los tejidos se perpetúan respuestas inmunológicas que evitan la cicatrización de las lesiones, donde uno de los principales mecanismos descritos está constituido por la formación de biofilm.

El biofilm bacteriano apical es clínicamente importante porque es resistente a terapia antimicrobiana, no puede ser removido por la preparación biomecánica sola y puede conducir a fracasos del tratamiento endodóntico, llevando en ocasiones a un riesgo de infecciones diseminadas. Por tanto el interés es su estudio es cada vez mayor. Sin embargo, su caracterización en componentes químicos ha sido limitada, debido a que la mayoría de los esfuerzos dentro del estudio del biofilm han sido orientados a su destrucción y/o disgregación.

Poco se sabe de la identidad, concentración y distribución de las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm extraradicular, en gran parte debido a las posibles permutaciones en su composición, así como a la dificultad que representa para las técnicas “convencionales”. En este sentido, la espectroscopia vibracional Raman han mostrado ser una técnica eficiente para la caracterización química del biofilm extraradicular, que brindara información valiosa para un mayor entendimiento de esta forma de vida microbiana.

2. TEORÍA

La boca, como otros hábitats en el cuerpo, está colonizada por una característica y compleja microbiota en toda la mucosa y superficies dentales. Esta microbiota está compuesta de más de 700 especies microbianas diferentes entre bacterias, virus, hongos y protozoos, siendo las bacterias el grupo más numeroso y diverso. La placa dental se forma dentro de minutos o pocas horas después de una limpieza profesional. Muchos estudios han indicado que la flora oral es responsable de las principales patologías orales; caries dental, enfermedad

periodontal, lesiones perirradiculares de origen pulpar como la periodontitis apical aguda y crónica. etc.

Tanto la periodontitis apical aguda como la crónica son producidas cuando el proceso carioso avanza y llega al tejido pulpar del diente. La pulpa es un tejido blando de origen mesenquimatoso con células especializadas considerado bajo condiciones normales un tejido estéril. Cualquier lesión de la pulpa puede desencadenar una respuesta inflamatoria de la misma. Si bien los irritantes pueden ser de naturaleza física, térmica o química, los microorganismos son considerados el principal agente etiológico.

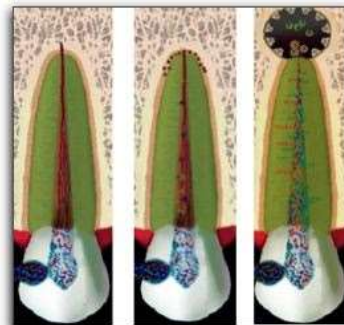


Figura 1 Evolución de la periodontitis apical

Por tanto, cuando el sistema inmune innato y adaptativo del tejido pulpar falla al controlar una invasión microbiana, esta progresa hasta establecerse una pulpitis, ocasionando una necrosis pulpar y el desarrollo de una periodontitis apical con la destrucción de hueso perirradicular. (Figura 1)

La endodoncia es una terapia recomendada para conservar la pieza dental la cual consiste en una adecuada preparación químico-mecánica del sistema de conductos radiculares bajo condiciones de asepsia, con un nivel óptimo de obturación y una adecuada restauración coronal provee un pronóstico de éxito favorable.

Sin embargo, la intrincada naturaleza de la anatomía del sistema de conductos radiculares ha complicado el completo desbridamiento en áreas como istmos, aletas, aplanamientos, anastomosis y otras irregularidades en las que permanece tejido, microorganismos y detritos después de la instrumentación. Al respecto, Nair y cols. en 2005 observaron el estado microbiano de un sistema de conductos radiculares necróticos en molares inferiores con periodontitis apical después de una terapia endodóntica en una sesión. Al evaluar los segmentos radiculares apicales mediante microscopía electrónica de transmisión encontraron que 14 de 16 dientes tenían infección residual intraconducto organizado a manera de biofilm.

Los biofilms microbianos representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica al proporcionar protección frente a fluctuaciones medio-ambientales de humedad, temperatura y pH. Esta capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos, si no que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formarlo. Este crecimiento se ha presentado en todas las áreas, es por eso que la literatura reporta la formación de biofilm en materiales de todo tipo en función directa de su humectabilidad, por lo cual la pieza dental con toda su compleja anatomía no es la excepción ya presenta una excelente humectabilidad. Diversas investigaciones indican que microorganismos provenientes del conducto radicular pueden invadir el área extraradicular a través del foramen apical, adhiriéndose al cemento que rodea el ápice radicular y formando un biofilm extraradicular. El biofilm extrarradicular tiene grandes implicaciones clínicas debido a que no pueden ser

removidos por la preparación biomecánica sola y a su gran resistencia a los agentes antimicrobianos lo que en muchas ocasiones puede conducir a fracasos del tratamiento endodóntico. Así mismo, el biofilm puede ir desprendiendo bacterias de su interior de forma paulatina para “distraer” la atención de los mecanismos de defensa del huésped, cronificando el proceso y ocasionando en el paciente picos de signos y/o síntomas puntuales que remiten tras la administración de antibióticos pero sin curar el origen del problema.

En cuanto a su composición, La matriz del biofilm es muy hidratada, por lo que el componente mayoritario es agua, el cual puede corresponder hasta un 97% del total. Pero además del agua y los componentes bacterianos, la matriz del biofilm está compuesta principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células, y existe una menor cantidad que corresponde a macromoléculas como proteínas, DNA y productos de la lisis bacteriana, lo que se conoce como sustancia polimérica extracelular. La composición de los biofilm parece ser únicas en su especie y les proporciona protección a la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos; es por eso que las infecciones por biofilm no consiguen ser completamente eliminadas y a causa de eso producen episodios recurrentes, ya que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que en su forma planctónica.

Diferentes técnicas se han empleado para visualizar la microestructura de biofilms así como para su caracterización. Entre las que se encuentran: Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopia Confocal de Barrido Laser (CLSM), Espectroscopia Vibracional Raman.

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación.

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre el un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia de la luz incidente.

Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar este ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destructiva. Asimismo, puede ser empleada para mediciones cualitativas y cuantitativas.

Provee espectros a manera de “huella digital” que permiten la caracterización e identificación de diferentes sustancias y sistemas biológicos incluyendo microorganismos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se dividió en tres fases consecutivas que se desarrollaron de la siguiente manera:

FASE CLÍNICA:

La fase clínica se desarrolló en las instalaciones de la Maestría en Endodoncia de la Facultad de Estomatología, UASLP.

Los pacientes candidatos a procedimientos de cirugía endodóntica se les realizó una historia clínica. Con base en inspección extraoral e intraoral, pruebas diagnósticas (palpación, percusión, movilidad, pruebas térmicas) y radiografías se estableció el diagnóstico de periodontitis apical crónica persistente. Se le brindó al paciente un plan de tratamiento y aquellos que cumplieron los criterios de inclusión se sometieron a procedimiento quirúrgico de cirugía apical. Se recolectaron un total de 15 muestras las cuales inmediatamente al ser obtenidas mediante la resección quirúrgica se lavaron con solución salina estéril y se colocaron en un tubo con caldo de tioglicolato prereducido (BD Fluid Thioglycollate Medium, BD Diagnostic Systems, Francia), todo este proceso fue llevado a cabo en un rango de esterilidad dada por medio del mechero en un radio de 30 centímetros.

FASE MICROBIOLÓGICA:

Esta fase se llevó a cabo en el Laboratorio multidisciplinario de Investigación de la Maestría en Endodoncia, UASLP. Las muestras obtenidas en la fase clínica y previamente colocadas en los tubos de tioglicolato se introdujeron en una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Inc. Modelo 2002 Michigan, USA), que mantenía condiciones de anaerobiosis estrictas (85% de N₂, 10% CO₂, 5% H₂) por un periodo de tiempo de 24-72 horas a una temperatura de 35°C, hasta alcanzar un desarrollo con una turbidez de 0.5 en escala de Mc Farland. Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Los tubos que contenían las muestras se agitaron con un vortex (Analog Vortex Mixer, Thomas Scientific) por 30 segundos para lograr homogeneizar el medio pre-reducido.
2. Se realizó la técnica de diluciones seriadas 10^{-1} - 10^{-4} .
3. Se tomaron 100µl de cada una de las diluciones realizadas y se sembraron cada una en una placa de agar sangre CDC anaeróbico con 5% de sangre de carnero (BBL Becton Dickinson de México, SA de CV). Las placas se dejaron incubando por 3 a 5 días en la incubadora contenida en la cámara de anaerobiosis a 37°C
4. A los cultivos puros se les identificó mediante el análisis de perfil bioquímico API 20 A (bioMérieux SA, Marcy-L'etoile) para identificación de anaerobios y API 20 strep (bioMérieux SA, Marcy-L'etoile) para identificación de streptococos o enterococos, conforme a las instrucciones del fabricante.

FASE ESPECTROSCÓPICA:

Esta fase se desarrolló en el Centro de Investigaciones en Óptica, A.C (Unidad Aguascalientes)

Las mediciones se realizaron con un microscopio óptico Leica (DMLM) que se encuentra integrado al sistema micro-Raman de Renishaw, modelo 1000B. (Figura 2)



Fig.2 Sistema micro-Raman Renishaw integrado a microscopio óptico Leica

Para iniciar la toma de espectros se realizó una calibración del sistema micro-Raman usando como referencia la banda de silicio cristalino en 520 cm^{-1}

La longitud de onda del láser de excitación fue de 830 nm (cercano infrarrojo) y fue dirigida hacia la muestra utilizando el objetivo $50\times$ del microscopio incorporado al sistema Raman. La potencia del láser sobre la muestra fue de 12.5 mW , con un tiempo de exposición de 30 s sobre la muestra. Un promedio de 15 espectros fueron colectados para cada una de las 15 muestras de biofilm en un rango espectral de los $100\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$.

Múltiples espectros fueron medidos en las diferentes zonas de biofilm para las diferentes piezas, con el fin de obtener la mayor cantidad de información sobre la composición química del biofilm.

Los espectros obtenidos fueron corregidos en su línea base, con el fin de eliminar la contribución de la fluorescencia.

Para el análisis de los espectros, se utilizó una base de datos de las principales moléculas de interés biológico provista por el Profesor Joke De Gelder. Los espectros del biofilm fueron comparados en sus características espectrales con los diferentes espectros de la base de datos, y así fueron identificados los posibles componentes del biofilm, los cuales, posteriormente fueron validados en términos de lo reportado en la literatura.

4. CONCLUSIONES

Las bacterias presentes en cavidad oral no se encuentran en su forma planctónica sino que crecen en comunidades conocidas como biofilm, éste método de crecimiento le brinda a las especies bacterianas un gran número de ventajas sobre la forma planctónica, la principal ventaja que le ofrece es protección contra otros microorganismos y contra agentes antimicrobianos, por lo que es importante estudiar la naturaleza y composición del biofilm no únicamente en cuanto a especies bacterianas sino saber cuáles son sus componentes químicos, cuáles son los minerales, polisacáridos, enzimas y todo aquello que le confiere sus propiedades a ese mundo microscópico que vive organizado y en armonía, pero que es

el principal agente causal de las enfermedades bucales más frecuentes. Desde hace tiempo se han estudiado las interacciones que se llevan a cabo entre las especies microbianas que habitan al interior del diente en el conducto radicular y las especies que habitan la parte externa de la raíz (parte apical) del diente en forma de biofilm.

El biofilm microbiano apical es clínicamente importante porque es resistente a terapia antimicrobiana, no puede ser removido por la preparación biomecánica sola y puede conducir a fracasos del tratamiento endodóntico, llevando en ocasiones a un riesgo de infecciones diseminadas. Por tanto el interés en su estudio es cada vez mayor. Sin embargo, su caracterización en componentes químicos ha sido limitada, debido a que la mayoría de los esfuerzos dentro del estudio del biofilm han sido orientados a su destrucción y/o disgregación.

Poco se sabe de la identidad, concentración y distribución de las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm microbiano apical, en gran parte debido a las posibles permutaciones en su composición, así como a la dificultad que representa para las técnicas “convencionales”. En este sentido, la espectroscopia vibracional Raman han mostrado ser una técnica eficiente para la caracterización química del biofilm extraradicular, que brindara información valiosa para un mayor entendimiento de esta forma de vida microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.J Möller, L. Fabricius, G. Dahlén, A.E Ohman, G. Heyden, “ Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys” Scand. J. Dent. Res., Vol. 89, 6, 1981, pp. 475-84
2. S. Kakehashi, H.R. Stanley, R.J. Fitzgerald, “The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats”, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., Vol. 20, 1965, pp. 340–349.
3. M.R. Leonardo, M.A. Rossi, L.A. Silva, I.Y. Ito, K.C. Bonifácio. “EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth”, J. Endod., Vol. 28,12, 2002, pp. 815–818.
4. D. Ricucci, M. Martorano, A.L. Bate, E.A. Pascon, “Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two cases”, Int. Endod. J., Vol. 38, 4, 2005, pp. 262–71.
5. S.J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections”. J. Science. Vol. 284, 5418, 1999, pp.1318–1322.
6. D. Ricucci, J.F. Siqueira, “Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure”, J. Endod. Vol. 34, 9, 2008, pp.1124–1129.

7. R. Pätzold, M. Keuntje, A. Anders-von Ahlften, “A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscop”, *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 386,2, 2006, pp. 286–292.