

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFFECTO DE PROTOPORFIRINA IX  
FOTOACTIVADA POR LÁSER SOBRE  
“BIOFILM” DE *ENTEROCOCO FAECALIS*.**

NÚMERO DE REGISTRO

2011-11

Tesis que para obtener la Especialidad en Endodoncia  
presenta:

C.D. Adriana Judith Beltrán Leal

DIRECTOR DE TESIS

PhD. Héctor Eduardo Flores Reyes

COTUTOR

CDEE. Vania Serrano Uzeta

ASESORA

DCM. María de Lourdes Verdugo Barraza

Culiacán Rosales, Sinaloa. Septiembre 2011.

## RESUMEN

**Introducción:** Como se ha establecido previamente, las bacterias son la principal causa de la enfermedad pulpar y perirradicular (Takehashi, 1965). Así, la bacteria aislada con mayor prevalencia de los conductos radiculares es el *Enterococo faecalis* (Rocas, 2004 y Siqueira, 2003). Una gran cantidad de irrigantes y medicamentos han sido probados para conocer su eficacia contra el *E. faecalis*; sin embargo, han sido probados en cultivos planctónicos, los cuales no representan las condiciones clínicas de infección de los conductos, donde la bacteria se asocia y adhiere a la pared dentinaria formando un biofilm. Este, le confiere propiedades fenotípicas de resistencia a irrigantes y medicamentos. En este contexto se hace necesaria la investigación de nuevos antibacterianos, tales como, la Terapia Fotodinámica (PDT) por sus siglas en inglés. Esta ha demostrado ser una alternativa para el tratamiento de las infecciones bacterianas recurrentes. Esta investigación pretende determinar “*in vitro*” el efecto de la acumulación de la protoporfirina IX (PpIX) inducida por la administración  $\delta$ -Acido aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) sobre el biofilm maduro de *E. faecalis*. Por ello se plantea la siguiente hipótesis: el efecto fotodinámico del láser sobre las bacterias que expresan PpIX provocará la muerte de las células formadores del biofilm. **Materiales y métodos:** una suspensión celular se preparó en tioglicolato y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^7$  cel. /ml, las cepas fueron expuestas a 40  $\mu\text{g/ml}$  de  $\delta$ -ALA con el fin de inducir la formación PpIX determinada por espectrofluorometría. Se seleccionó para biofilm una concentración de 80  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de  $\delta$ -ALA, para los grupos experimentales. Después fueron irradiados con láser a 532 nm; se determinó la viabilidad celular por fluorescencia con el microscopio confocal. **Resultados:** se comprobó la acumulación de PpIX endógena en las células bacterianas y se obtuvo la disminución en un 100% de la viabilidad celular respecto al control. **Conclusión:** la concentración de  $\delta$ -ALA actuó como bactericida, fotoactivado con láser sin disgregación previa del biofilm.

**Palabras Clave:** *Enterococo faecalis*, biofilm, Acido aminolevulínico, Protoporfirina, Terapia fotodinámica.

## ABSTRACT

Introduction: As previously stated, the bacteria are the main cause of pulpal and periradicular disease (Kakehashi 1965). Thus, the most prevalent bacteria isolated from root canals is *Enterococcus faecalis* (Rocks, 2004 and Siqueira, 2003). A lot of irrigants and medications have been tested to determine its efficiency against *E. faecalis*, but crops have been tested in plankton, which do not represent the clinical condition of infection of the ducts, where the bacteria is associated with and adhere to the dentinal wall, forming a biofilm. This gives it resistance phenotypic properties of irrigants and medications. In this context it is necessary to search for new antibacterials, such as photodynamic therapy (PDT) for its acronym in English. This has proven to be an alternative for the treatment of recurrent bacterial infections. This research aims to determine "in vitro" effect of the accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) induced by the administration  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) on mature biofilm *E. faecalis*. Thus arises the following hypothesis: the laser photodynamic effect on bacteria expressing PpIX cause the death of biofilm-forming cells. Materials and methods: A cell suspension was prepared in thioglycolate and adjusted to a concentration of  $5 \times 10^7$  cel. / ml, the strains were exposed to 40 mg / ml  $\delta$ -ALA in order to induce PpIX formation determined by spectrofluorometry. Biofilm was selected for a concentration of 80  $\mu$ g /  $\mu$ l of  $\delta$ -ALA, for experimental groups. They were then irradiated with laser at 532 nm, cell viability was determined by fluorescence confocal microscopy. Results: We found endogenous PpIX accumulation in bacterial cells and obtained a 100% decrease in cell viability compared to control. Conclusion: The concentration of  $\delta$ -ALA acted as bactericidal, photoactivated laser without prior disintegration of the biofilm

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, biofilm, photodynamic therapy, aminolevulinic acid.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Definición de biofilm .....	8
2.2. Interacciones entre especies en el biofilm.....	11
2.3 Resistencia del biofilm a los antimicrobianos y respuesta del huésped .....	13
2.4 Biofilm en Endodoncia.....	14
2.5 Características morfológicas y de cultivo de <i>E. faecalis</i> .....	16
2.6 Factores de virulencia y supervivencia de <i>E. faecalis</i> .....	18
2.7 Infecciones endodónticas de <i>E. faecalis</i> .....	19
2.8 Biofilm de <i>E. faecalis</i> .....	20
2.9 Definición de Terapia Fotodinámica (PDT) .....	21
2.10 $\beta$ - ácido aminolevulínico ( $\beta$ -ALA).....	24
2.11 La PDT en la terapia de conductos .....	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
4. JUSTIFICACIÓN .....	29
5. OBJETIVOS .....	31
5.1 Objetivo general .....	31
5.2 Objetivos específicos .....	31
6. HIPÓTESIS .....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
7.1 Diseño del estudio.....	33
7.2 Definición conceptual y operacional de las variables .....	33
7.2.1 Variable independiente.....	33
7.2.2 Variable dependiente .....	34
8. RESULTADOS .....	43
9. DISCUSIÓN.....	49
10. CONCLUSIÓN.....	54
Perspectivas .....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	55

ANEXOS. .... 60

## 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal del tratamiento de conductos en los órganos dentales es la eliminación o al menos la reducción del número de microorganismos presentes en el sistema de conductos.<sup>1</sup> Desafortunadamente la esterilización completa del sistema de conductos se percibe como un objetivo académico más que clínico.<sup>2</sup> La principal dificultad para la eliminación de los microorganismos en endodoncia es la anatomía del sistema de conductos así como la organización bacteriana compleja en forma de “biofilm”(biopelícula) que se puede definir como una estructura asociativa de una o varias estirpes bacterianas. La importancia de esta forma de vida se debe a que, ésta les confiere mayor resistencia que las bacterias en suspensión y se ha atribuido como una de las principales causas de fracaso de tratamiento endodóntico.<sup>3, 4</sup>

La complejidad del “biofilm” ha promovido su estudio; no sólo estudiando individualmente la vida bacteriana sino sus interacciones para obtener datos más reales y proponer tratamientos más específicos.<sup>5</sup> Por tal motivo, la formación y evolución de este se ha experimentado *in vitro* promoviendo un medio en cual pueda darse la agregación bacteriana y de esta manera tratar de conocer su formación, vida, crecimiento y maduración. Numerosos estudios demuestran que *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) es uno de los microorganismos con mayor capacidad de autoagregarse en esta forma de vida; se ha mencionado que la resistencia de esta bacteria a ser eliminada del

interior del conducto, ya sea con instrumentación, irrigación y/o con medicación intraconducto, se debe a que puede asociarse en forma de biofilm.<sup>6-8</sup> Una alternativa que podría ser utilizada como bactericida de las células involucradas en la formación del biofilm es la terapia fotodinámica PDT (por sus siglas en inglés), descrita en Alemania a principios del siglo XX por H. Von Tapennier; definida como la combinación de 3 componentes individuales no tóxicos: un agente fotosensibilizador, luz que activa el agente, y oxígeno que a través de excitación por la activación del fotosensibilizador producirá oxidoreducción altamente reactiva para los microorganismos.<sup>9</sup> Un fotosensibilizador frecuentemente utilizado es el  $\delta$ -ácido aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) que induce a la producción de protoporfirina IX (PpIX) endógena en los microorganismos y una vez fotoactivada producirá una reacción química con la resultante formación de especies oxigenadas reactivas llevando a la muerte celular.<sup>10</sup> El propósito de este estudio es evaluar el efecto de la inducción de PpIX por  $\delta$ -ALA, y fotoactivación de la PpIX con luz láser de 532 nm sobre el biofilm de *E. faecalis*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Definición de biofilm

El biofilm fue definido por Marshall en 1976, describiéndolo como finas fibrillas de polímero extracelulares con microorganismos anclados a la superficie.<sup>11</sup>

Costerton y cols. (1994) observaron que esas comunidades de microorganismos anclados en un sistema acuático se encontraban cubiertas en una matriz de glucocalix, el cual ayudaba a su adhesión.<sup>12</sup> También afirmaron que la unión desencadena la expresión de genes en los microorganismos que controlan la producción de componentes necesarios para la adhesión y formación de biofilm, enfatizando que el proceso de la elaboración del biofilm es regulado por genes específicos transcritos durante la adhesión celular inicial (Quorum sensing).

Una nueva definición descrita por Donlan y Costerton (2002) sobre biofilm menciona que es una comunidad caracterizada por células que están irreversiblemente unidas a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz de sustancia polimérica extracelular auto producida, así como una alteración fenotípica con respecto a su crecimiento y transcripción genética.<sup>11, 12</sup>

Distel y cols. (2002) describieron el biofilm como una estructura asociativa de una o varias estirpes bacterianas, embebidas en una

matriz extracelular de polisacáridos auto producida, que se encuentra adherida a una superficie o sustrato.<sup>13</sup>

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el biofilm es un ecosistema bacteriano proliferante y enzimáticamente activo. Los biofilms se unen a superficies inertes, tanto biológicas como sintéticas. Dentro de las biológicas optan preferentemente por tejidos necróticos.<sup>14</sup>

En investigaciones realizadas sobre biofilm, fue percibido por un crecimiento no estructurado de células microbianas, rodeadas por matrices de exopolisacáridos, esas percepciones fueron erróneamente descritas, debido a que las técnicas de fijación y observación no eran adecuadas para la correcta observación e interpretación del biofilm. En la década de los 50's, el microscopio confocal comenzó a utilizarse para estudiar los microorganismos. Este microscopio permite realizar cortes seriados de estructura compleja, en la cual se requiere poca preparación de las muestras; permite estudiar organismos vivos utilizando técnicas de fluorescencia. La primera observación de biofilm in vivo utilizando un microscopio confocal produjo una serie de especulaciones fehacientes de los recientes conceptos de biofilm.<sup>11</sup>

Las formas de dicho biofilm se han descrito desde pequeñas formaciones hasta cadenas.<sup>14</sup> Sin embargo, la forma más característica es la de forma de champiñón (mushroom-shape); esta se observa al microscopio como estructura unitaria dentro de la matriz de polisacárido. Se cree que los canales presentes en este tipo de estructura hacen posible la distribución de nutrientes y la eliminación de

los residuos, así como la atenuación de los agentes externos, como antibióticos, irrigantes y medicaciones intraconducto. Se menciona que este tipo de vida bacteriana se trata de un alto nivel de organización, con un primitivo sistema circulatorio (los canales de agua). Además, en estudios recientes se observó que en estas formaciones sólo se originan en colonias de larga evolución y no en los casos de colonias jóvenes e inmaduras.<sup>15</sup>

Un biofilm está compuesto aproximadamente de un 15% de volumen celular y una masa no celular de 85%. La sustancia polimérica extracelular (EPS) representa el alojamiento de las células del biofilm, los EPS establecen las condiciones necesarias de la vida celular de esta matriz, la cual provee un microambiente que puede ser afectado por la porosidad, densidad, contenido de agua, cargas, propiedades de absorción, hidrofobicidad y estabilidad mecánica.<sup>16</sup>

Los EPS son biopolímeros de origen microbiano en el cual los microorganismos se encuentran inmersos, son más que sólo polisacáridos, cuentan con una amplia variedad de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos así como también cantidades de DNA extracelular. La matriz de EPS tiene componentes como la capacidad de interactuar, un ejemplo de ello la retención de proteínas extracelulares como la lipasa; tal mecanismo resulta imprescindible para la efectiva degradación de ciertos polímeros.<sup>16</sup>

## 2.2. Interacciones entre especies en el biofilm

La mayoría de los biofilms están constituidos por múltiples especies de microorganismos, tanto eucariotas como procariotas. Se sabe de una potencial comunicación entre diferentes especies, como también una alta competición y cooperación entre ellas<sup>17</sup>. Esta asociación puede darse entre la misma o bien, entre distintas especies. La primera de ellas se denomina autoagregación y la segunda coagregación. La coagregación es considerada una forma de biofilm más compleja y difícil de eliminar, ya que bacterias de distinta especie pueden compartir distintos mecanismos de defensa en pro del mantenimiento de la comunidad asociada en el biofilm.<sup>16,18</sup>

La cavidad oral contiene comunidades microbianas multi especies con interacciones entre ellas tales como:

- 1) Competición entre bacterias por los nutrientes.
- 2) Interacciones sinérgicas, las cuales estimulan el crecimiento y supervivencia.
- 3) Producción de antagonistas por un residente el cual inhibe el crecimiento de otras.
- 4) Neutralización de sustancia antagónica de un microorganismo hacia otro.
- 5) Interferencia en el crecimiento dependiente de microorganismos de señalización.

Las especies del género *Prevotella* por citar alguno, son frecuentes debido a su capacidad de autoagregarse y coagregarse.<sup>17</sup> Otros

autores opinan que el *Fusobacterium nucleatum* es el componente central de muchos de los biofilms en infecciones odontogénicas, gracias a su gran capacidad de coagregación.<sup>19,20</sup> Ozok y cols. (2007) encontraron sinergismo en la asociación en forma de biofilm de *P. coccusmicros* y *F. nucleatum*.<sup>18</sup> Por otro lado, Metzger y cols. (2009) comprobaron en varios estudios la importancia del *F. nucleatum* para iniciar biofilms y la afinidad con la *Porphyromonas gingivalis*.<sup>20</sup>

Respecto al biofilm de *Enterococcus faecalis*, se ha mencionado que la resistencia de esta bacteria a ser eliminada del sistema de conductos, con la preparación biomecánica y con la medicación intraconducto, además de mantenerse latente y durante la acción de esta, se debe a que puede asociarse y mantenerse en forma de biofilm.<sup>21-23</sup> George y cols. (2005) analizaron la ultraestructura del biofilm de *E. faecalis* combinando medios ricos y pobres en nutrientes con medios aeróbicos y anaeróbicos en dientes extraídos.<sup>24</sup> En sus resultados, mencionaron que el biofilm con mayor madurez y organización es el que se forma en un medio anaeróbico, pobre en nutrientes y encontraron que en este biofilm había un mayor porcentaje de calcio. Además describieron las estructuras características en forma de champiñón y canales de agua descritas por Distel y cols. (2002)<sup>13</sup>. Sin embargo, en un medio aeróbico y rico en nutrientes formaba más cantidad de biofilm pero de pobre organización, aunque con gran eficiencia al colonizar en profundidad los tubulillos dentinarios. Por lo tanto, en este estudio pudieron concluir que el desarrollo, la adaptación, la supervivencia en el sistema de

conductos y la profundidad de penetración de los tubulillos dentinarios por el biofilm de *E. faecalis* son regulados por las condiciones ambientales en que el biofilm se presente.

### **2.3 Resistencia del biofilm a los antimicrobianos y respuesta del huésped**

La naturaleza de la estructura de biofilm y los atributos fisiológicos de los organismos de esta comunidad le confieren una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos, como pueden ser los antibióticos, desinfectantes o germicidas.

Donlan y cols. (2002) demostraron diferencias importantes en la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos en organización de biofilm o microorganismos planctónicos, la resistencia puede estar dada por varias razones tales como:

1. Ausencia de penetración del antimicrobiano a través de la estructura de biofilm.
2. Alteración en el crecimiento de las células de biofilm.
3. Cambios fisiológicos en el modo de crecimiento de biofilm.<sup>11</sup>

Además los microorganismos poseen una protección adicional después de su adhesión a la superficie, esto da como resultado un incremento en la resistencia a los agentes antimicrobianos, que en algunos casos puede aumentar hasta 1000 veces su capacidad de resistencia que la de las bacterias que se encuentran en forma planctónica. Por lo tanto, la formación de biofilm se ha mencionado como un mecanismo de

virulencia de las bacterias. Existe evidencia que las bacterias alojadas en forma de biofilm son más resistentes a la clorhexidina, aminas fluoradas, amoxicilina, doxiciclina, vancomicina y metronidazol.<sup>12</sup>

## 2.4 Biofilm en Endodoncia

La importancia para la Endodoncia de esta forma de vida bacteriana es la resistencia que le confiere el biofilm contra los agentes bactericidas y esto se ha postulado como una causa de fracaso de tratamientos de conductos Leonardo y cols. (2002), aunque es un concepto relativamente nuevo en endodoncia.<sup>25</sup> Chávez de Paz y cols. (2007) opinan que el biofilm no es raro ni poco frecuente en el conducto necrótico, sino que es la forma de vida bacteriana más habitual, y que es incorrecto pensar que son entidades excepcionales o poco frecuentes en la enfermedad endodóntica de larga evolución.<sup>26</sup> La teoría más aceptada de la formación, consta de cuatro fases y fue descrita por Svensater y Bergenholtz (2004), las fases son las siguientes :

- 1) Forma una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos derivados de las bacterias en suspensión, del proceso necrosis e inflamación.
- 2) Sobre esa película pegajosa, se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión.
- 3) La primera capa de bacterias ya adherida, segrega mediadores que, van fijando más y más bacterias, (Quórum sensing) de esa estirpe o de otras; y por otro lado se va formando la matriz

extracelular de polisacárido, primera barrera defensiva característica del biofilm.

- 4) El biofilm va madurando y creando sistemas de defensa más complejos. Al mismo tiempo, libera bacterias al exterior que por su evolución hacen crónica la respuesta inflamatoria del huésped.<sup>27</sup>

Otros autores como Mario R. Leonardo (2002) y J.F. Siqueira Jr. (2003) propusieron y comprobaron la presencia de biofilm en la superficie perirradicular externa, el primero en un estudio donde se compararon 3 diferentes grupos de 21 órganos dentales extraídos; 5 órganos dentales con pulpa vital para el primer grupo, el segundo 8 órganos dentales con necrosis sin lesión radiográfica visible y el tercero 8 órganos dentales con necrosis y lesión radiográficamente visible. Fueron observados con magnificación hasta 10,000 X en un microscopio electrónico de barrido, los resultados obtenidos comprobaron la presencia de resorción cementaria en área perirradicular, así como la presencia de biofilm bacteriano.<sup>25,28</sup>

Otra característica importante de la evolución del biofilm es que puede aislarse del hábitat que le rodea, si este se vuelve exageradamente hostil y se han descrito formaciones en estado inerte en medios extremos. El biofilm puede mantener dicho estadio por un tiempo, a la espera de que el estado del medio mejore. Si el medio ambiente mejora, abandonará el estado de latencia y seguirá desarrollándose. Si el ambiente extremo se mantiene tiempo suficiente, puede hacer

inviabilidad la existencia del biofilm. Por ello, los estudios enfocan el tratamiento hacia la eliminación directa o indirecta del biofilm.<sup>29,30</sup> Molander, Siqueira y Sundqvist (1998) mencionaron que *E. faecalis* es una de las bacterias más comúnmente aislada y suele ser predominante en el conducto radicular. Otros autores que mencionaron la importancia de *E. faecalis* al obturar las raíces de dientes con periodontitis apical lo ha convertido en un foco de atención así como un factor etiológico de la enfermedad postratamiento<sup>22, 31,32</sup> fueron Rocas y Chavez de Paz (2004), quienes así mismo afirmaron la capacidad de esta bacteria a subsistir y adaptarse en forma de biofilm.<sup>33, 34</sup>

## 2.5 Características morfológicas y de cultivo de *E. faecalis*

Los *Enterococos* son cocos Gram-positivos. Colonizan el tracto gastrointestinal y genital de los humanos. Estos están asociados con la comunidad y las infecciones hospitalarias.<sup>31</sup> Pueden crecer en un rango de temperatura entre 10 y 42°C y en ambientes con valores de pH amplio. Si bien hay más de 15 especies de *Enterococos*, el 80-90% de los aislados clínicos son de *E. faecalis*.<sup>35,36</sup> Estos suelen formar cadenas cortas o están dispuestos en pares; sin embargo, bajo ciertas condiciones de crecimiento se alargan y aparecen cocobacilos. En general, los *Enterococos* son alfa-hemolíticos. Algunos poseen el grupo D de Lancefield antígeno y puede ser detectado mediante anticuerpos monoclonales basados en las pruebas de aglutinación. Los *Enterococos* son generalmente catalasa negativos y anaeróbicos,

capaces de crecer en 6,5% de NaOCl, pueden hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares al 40%. *E. faecalis* ha demostrado que presentan un desafío terapéutico debido a su resistencia a muchos antimicrobianos, aminoglucósidos, penicilina, ampicilina y vancomicina. Los *enterococos* también tienen la capacidad de adquirir una amplia variedad de factores de resistencia a los antibióticos, los cuales presentan serios problemas en el manejo de pacientes con infecciones enterocócicas. En general, los *enterococos* aislados con susceptibilidad baja a la vancomicina pueden ser categorizados como vanA, vanB, y vanC; representando la mayor amenaza vanA y vanB, debido a que son los más resistentes.<sup>30</sup>

Los genes de resistencia se realizan en un plásmido fácilmente transferibles, por lo que *E. faecalis* puede transferir estos plásmidos por conjugación.<sup>35</sup>

La pared celular de *E. faecalis* es de 20 a 38% del peso seco de células (en las células en fase exponencial y estacionaria), dado que la *E. faecalis* es una bacteria Gram-positiva, hay tres componentes principales que conforman su pared celular: peptidoglicano en un 40%, ácido teicoico y polisacáridos. Dentro de las funciones del peptidoglicano una es ayudar a resistir la ruptura inducida por la alta presión osmótica del citoplasma.

El *E. faecalis*, es considerado como un microorganismo generalmente no encapsulado,<sup>33</sup> sin embargo, los subconjuntos de *E. faecalis* aislados pueden poseer un polisacárido capsular que intercambie material

genético (plásmidos) por procesos inducidos por la conjugación de las feromonas péptido pequeño (proteína de la superficie que actúa como sustancia de agregación reconociendo un ligando específico en las células receptoras), éstas aseguran las conexiones correctas para la conjugación.<sup>35</sup> La información contenida en el genoma de *E. faecalis* V583 será de gran ayuda para la comprensión de cómo el organismo se ha adaptado a ser un patógeno humano versátil.<sup>36</sup>

## **2.6 Factores de virulencia y supervivencia de *E. faecalis***

El *E. faecalis* posee ciertos factores de virulencia tales como: enzimas líticas como la hemolisina, gelatinasa, citolisina, sustancias de agregación, feromonas y el ácido lipoteicoico.<sup>35</sup> Se ha demostrado que se adhieren a las células huésped, expresan proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas, y así alterar las respuestas del huésped. Es capaz de suprimir la acción de los linfocitos, lo que podría contribuir a la persistencia de microorganismo en el huésped.<sup>36</sup> *E. faecalis* no se limita a la posesión de varios factores de virulencia, también es capaz de compartir estos rasgos de virulencia entre las diferentes especies mediante la conjugación, esto contribuye a su supervivencia, persistencia y capacidad de causar la enfermedad en el sistema de conductos.

Así mismo, posee serina proteasa, proteína gelatinasa y la unión del colágeno (Ace) o sustancia de agregación, que contribuyen a la unión del microorganismo a la dentina. Este, es lo suficientemente

pequeño como para invadir con soltura y vivir dentro de los tubulillos dentinarios.<sup>37</sup> Tiene la capacidad de soportar períodos prolongados de hostilidad hasta que las condiciones nutricionales mejoran. Una vez que las condiciones del medio ambiente son favorables las células que se encuentran en estado de latencia se pueden recuperar mediante la utilización del suero como una fuente nutricional. El *E. faecalis* ha demostrado resistir la acción del hidróxido de calcio cuando se coloca como medicación intraconducto a más de 10 días.<sup>14</sup> También tiene la capacidad de formar biofilm, lo que le confiere a esta bacteria una resistencia a los agentes bactericidas de hasta mil veces mayor a la fagocitosis, a los anticuerpos y a los antimicrobianos. Presenta también la capacidad de mantener el pH en un estado homeostático, lo cual ocurre como resultado de los iones que penetran a la membrana, así como la capacidad amortiguadora del citoplasma. *E. faecalis* tiene una bomba de protones que disminuye el pH interno y esta ofrece un medio adicional para mantener la estabilidad del pH interno.<sup>38</sup>

## **2.7 Infecciones endodónticas de *E. faecalis***

El *E. faecalis* es un habitante normal de la cavidad oral, la prevalencia es mayor en los pacientes con historial de tratamiento de conductos previo. También se asocia su presencia en la lesión endodóntica primaria, aunque la aparición en la lesión endodóntica persistente es nueve veces más frecuente.<sup>39, 40</sup> La microbiota que se encuentra en los dientes con fracaso endodóntico es

predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva, siendo el *E. faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia.<sup>41</sup> La habilidad de *E. faecalis* de causar enfermedades periapicales y fracasos en órganos dentales con tratamiento de conductos previo, puede deberse a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios, mantenerse viable dentro de estos así como la capacidad de formar biofilm.<sup>42-45</sup>

## 2.8 Biofilm de *E. faecalis*

El *E. faecalis* es a menudo aislado de biofilm asociado a las infecciones crónicas. La inherente habilidad de esta bacteria a resistir los medios hostiles, los pH extremos y las concentraciones salinas altas, además de las cepas resistentes a los antibióticos son solo algunos de los retos contra *E. faecalis* en el intento de mediar las infecciones clínicas que causa.<sup>14</sup> Este microorganismo posee un genoma que contiene tres EBP (endocarditis biopelícula asociada a pili), así como también operones que son importantes para la producción de biofilm. Esta cepa utiliza estos operones para producir “pili superficie”. Los “pili superficie” se utilizan para la adherencia a las superficies durante la endocarditis por ejemplo;<sup>37</sup> la adhesión microbiana a las células huésped es una etapa crucial en la patogénesis de la infección, independientemente del síndrome o infección. Cepas de *E. faecalis* han sido aisladas de pacientes con endocarditis y muestran que tiene una mayor capacidad para adherirse a las células del corazón de Girardi, a las células epiteliales del tracto urinario in vitro, lo que sugiere que la adhesión al

endotelio vascular puede ser importante ya que actúan en la unión de las bacterias a las proteínas de la matriz extracelular y funcionan como adhesinas.<sup>35</sup> Dadas las características de *E. faecalis* y su capacidad de formar biofilm, sin mencionar la resistencia que éste le confiere a los antibióticos, germicidas y bactericidas es necesario investigar y experimentar alternativas para la eliminación de las células bacterianas formadoras de biofilm como la terapia fotodinámica (PDT).

## 2.9 Definición de Terapia Fotodinámica (PDT)

La fototerapia fue desarrollada a comienzos del siglo XX por Niels Finsen (1895) quien usó luz roja para prevenir exitosamente la supuración de las pústulas de la viruela. Siguió con el tratamiento de la tuberculosis cutánea usando irradiación ultravioleta para lo cual él desarrolló el arco de carbono para fototerapia. Sus investigaciones le merecieron el Premio Nobel en 1903.<sup>46</sup>

Mientras que la fototerapia describe el uso de luz en el tratamiento de la enfermedad, la fotoquimioterapia involucra la administración de agentes fotosensibilizantes seguido de irradiación de luz. Esta técnica ya fue aplicada hace 3 mil años por los hindúes y los egipcios para tratar desórdenes de la piel en combinación con ciertas plantas y luz solar. Desde hace algunas décadas, otra metodología terapéutica usa luz como mediador, recibiendo creciente atención, debido a su destacada selectividad; La Terapia Fotodinámica (PDT), fue descrita por primera vez en Alemania en el comienzo del siglo XX. Un estudiante de

doctorado llamado O. Raab y su asesor H. Von Tappeiner (1904) estudiaron el letal efecto de algunas muertes en paramecios. Ellos descubrieron que la luz tenía fuerte influencia en la supervivencia de los parásitos incubados en acridina.<sup>10</sup> Pocos años más tarde, Von Tappeiner observó que el oxígeno también estaba involucrado en este fenómeno y se propuso el término dinámico para precisar la contribución del oxígeno y para diferenciarlo de la fototerapia. Desde estos primeros ensayos la PDT ha evolucionado a una moderna área de investigación, que busca proveer alternativas no invasivas en el tratamiento de un gran número de patologías. La PDT ha sido definida como la combinación de 3 componentes individuales no tóxicos los cuales son:

- 1) Un agente fotosensibilizador (fotosensibilizador, PS)
- 2) Luz que activa el PS
- 3) Oxígeno que a través de excitación por la activación del PS se transforma en especies oxigenadas altamente reactivas y tóxicas (alto poder de oxido-reducción).<sup>46</sup>

La selectividad de PDT se atribuye a la contribución de cada uno de los parámetros antes mencionados. En primer término, el PS se acumula selectivamente en el tejido blanco debido a alteraciones fisiológicas en el entorno patológico como por ejemplo vasos perforados, actividad enzimática anormal, variaciones de pH o reducción del drenaje linfático. En segunda instancia, la irradiación local del área enferma. Finalmente la muy corta vida media de las especies oxigenadas reactivas limita el

daño al tejido blanco. El interés en la PDT ha aumentado debido a sus numerosas ventajas. Es una técnica no invasiva, a diferencia de la cirugía y no induce toxicidad acumulativa como sucede en la quimioterapia y radioterapia.<sup>47</sup> Desde el primer tratamiento PDT con eosina tópica, descrito por Wainwright (2008) se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos de fototoxicidad y se han desarrollado fotosensibilizantes optimizados.<sup>48</sup> En ese contexto, macrociclos tetrapirrólicos como porfirinas, porfirinas expandidas y clorinas han sido extensamente investigados en fotomedicina.

Las primeras porfirinas usadas en la PDT fueron diferentes hematoporfirinas extraídas de la sangre, impuras y no homogéneas, las cuales producían fotosensibilización de larga duración, alta variabilidad en la respuesta al tratamiento, espectro de absorción desfavorable y baja selectividad. A partir de este experimento inicial, numerosos fotosensibilizantes pertenecientes a los grupos de porfirinas, clorinas, texafirinas y purinas han sido probados clínicamente.

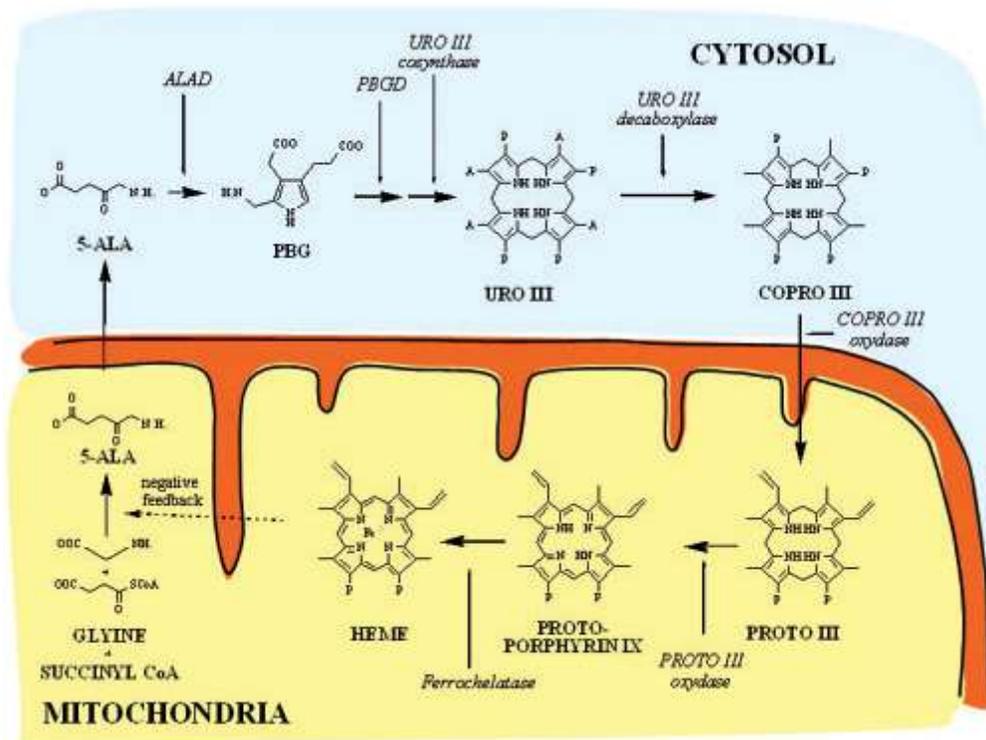
En la década de los 60's, algunos investigadores observaron que la fotosensibilidad cutánea y otros efectos secundarios luego de la administración de porfirina exógena eran similares a los que sufrían los pacientes afectados de porfiria.

Estas observaciones llevaron al descubrimiento de que la administración de ciertas drogas y productos químicos a animales normales puede producir un síndrome similar a la porfiria, conocido hoy como porfiria inducida por drogas o porfiria química. Si bien inicialmente

fue usada como modelo experimental en la investigación de ésta, dio nacimiento al concepto de fotosensibilización mediada por  $\delta$ - clorhidrato de ácido aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) o también conocido como 5-ácido aminolevulínico (5-ALA) inicialmente aplicado en estudios preclínicos para propósitos fotodinámicos.<sup>48</sup>

### **2.10 $\delta$ - ácido aminolevulínico ( $\delta$ -ALA).**

Clínicamente el  $\delta$ -ALA fue introducido en PDT por Kennedy y cols. en 1990,  $\delta$ -ALA es un precursor de la protoporfirina IX (Pp IX) en la ruta de biosíntesis del grupo hemo.<sup>49</sup> Ciertos tipos de células tienen la gran capacidad de sintetizar PpIX cuando se expone a una concentración adecuada exógena de  $\delta$ -ALA. Ellos observaron que la fotosensibilización por PpIX estaba fundamentalmente confinada a desórdenes cutáneos superficiales, posterior a la administración tópica de  $\delta$ -ALA en solución acuosa.<sup>47</sup>



**Figura 1:** El esquema representa la biosíntesis del grupo Hemo que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial de la mayoría de todas las células vivas. El ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) es formado en los mamíferos por condensación de la glicina con succinil-CoA. Dos moléculas de 5-ALA se ensamblan para formar porfobilinógeno (PBG), y 4 moléculas de PBG son combinadas para formar un tetrapirrol. Luego de la ciclación del tetrapirrol, el uroporfirínógeno III (UROIII) sufre una serie de decarboxilaciones enzimáticas resultando en la formación de protoporfirina IX (PpIX), la molécula fotoactiva deseada en la PDT mediada por 5-ALA. La ferroquelatasa, una enzima menos activa en las células tumorales, introduce un átomo de hierro en la PpIX para formar el hemo, la fracción biológicamente activa pero no fotoactiva. El HEMO ejerce una retroalimentación negativa en la formación del 5-ALA que es interferida por la administración exógena de 5-ALA. (A=acetato, P=propionato) fuente Shemin D: An illustration of the use of isotopes<sup>50</sup>

## 2.11 La PDT en la terapia de conductos

En cuanto al uso de la PDT en la terapia endodóntica convencional, esta consiste en un agente fotosensibilizante absorbido selectivamente por el organismo responsable de la infección, en este caso la persistencia de la infección se atribuye a la anatomía del sistema de conductos y a la formación de biofilm. Uno de los microorganismos que es sabido pertenece a este grupo bacteriano es el *E. faecalis* microorganismo anaerobio facultativo, Gram-positivo.

Como ya ha sido mencionado, la resistencia de esta bacteria a ser eliminada del interior del conducto, ya sea con instrumentación, irrigación y/o con medicación intraconducto, se debe a que puede asociarse en forma de “biofilm”.<sup>51-53</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estados degenerativos pulpares, dependiendo de algunos factores intrínsecos, pueden avanzar rápida o lentamente hacia la muerte pulpar, lo que implicaría el cese de los procesos metabólicos de este órgano;<sup>54</sup> aun tras la preparación biomecánica aparentemente adecuada pueda evolucionar a una enfermedad endodóntica persistente, siendo esta un aspecto fundamental en el fracaso del tratamiento de conductos, que tiene su etiología basada en la presencia y subsistencia del “biofilm” tanto intrarradicular como extrarradicular.<sup>55</sup>

En la actualidad, existen diversos protocolos de desinfección, entre los cuales, se incluye el uso de una solución irrigante que penetre en ciertas zonas del sistema de conductos; el cual debe poseer ciertas características tales como: ser capaz de degradar tejido orgánico, actuar como bactericida, bacteriostático y que posea baja tensión superficial sin afectar los tejidos perirradiculares. Sin embargo, dichas características parecen no ser propias de un sólo agente bactericida.<sup>56</sup>

El irrigante más conocido y comúnmente utilizado es el hipoclorito de sodio, que se ha demostrado es el único que cumple con la mayor cantidad de las características necesarias del irrigante ideal aun, cuando es altamente citotóxico.<sup>18</sup>

Actualmente se han propuesto técnicas alternativas de desinfección que puedan ser empleadas como complemento de la irrigación durante el tratamiento de conductos, que contribuyen a la eliminación del biofilm bacteriano tanto intrarradicular como extrarradicular. Una de estas

propuestas es la terapia fotodinámica, la cual es altamente selectiva, no citotóxica, y permanece inocua mientras sea inactiva.

Por tal motivo se precisa de la investigación de estas técnicas innovadoras que podrían emplearse en la desinfección del sistema de conductos, especialmente sobre las asociaciones bacterianas resistentes.

De esta manera se podrá responder, si es el  $\delta$ -ALA-PDT capaz de penetrar el biofilm de *E. faecalis* y actuar sobre las células que forman a este, logrando su disgregación y eventual remoción.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Como ha sido demostrado por un gran número de investigadores, el biofilm crece en medios pobres en nutrientes, aunque presentan un número de bacterias significativamente menor que los de medios ricos, aumentan el ratio calcio/fosforo en suspensión y degradan más la dentina que les rodean, por lo que se cree que, en esas circunstancias de supervivencia compleja, tienden a calcificarse para aumentar sus defensas y ser más resistentes.<sup>57</sup> Aun después de la preparación biomecánica convencional, es posible que una buena obturación termine por englobar bacterias no eliminadas de primera instancia, disminuyendo su espacio vital eliminando las comunicaciones y el aporte de nutrientes desde el medio bucal y/o periapical, haciendo que estas mueran por déficit de nutrientes. Pero, si no es así, es fácil que puedan sobrevivir al tratamiento de conductos, por tanto, es necesario que un bactericida muestre capacidad de penetración antes que de desinfección, ya que si no hay contacto con la infección, ni el mejor desinfectante podrá mostrar eficacia, además, si el irrigante no ha abierto camino previo, aun siendo altamente fluido es mucho menos probable que lo haga la obturación esto, por razones físicas.<sup>18</sup> Dentro del conducto radicular, el "biofilm" se puede encontrar a lo largo de todo su recorrido, pero es el tercio apical la zona más predispuesta a su anidamiento. En ella, se dan los factores adecuados para su formación como: anatomía compleja, menor acción de los irrigantes y medicamentos intraconducto, baja tensión de oxígeno y poco acceso a

nutrientes provenientes de los tejidos pulpares y/o periapicales.<sup>3</sup> En casos de necrosis de larga evolución el “biofilm” encuentra un hábitat adecuado para desarrollarse y perpetuarse a lo largo del tiempo, lo cual mostrará no obstante, repercusiones no solo dentro del sistema de conductos si no también fuera de él.<sup>58</sup>

Diversos estudios han evaluado la presencia de biofilm en la superficie externa de la raíz y se ha mencionado como una causa de lesión periapical persistente.<sup>25, 43, 44</sup> Por lo tanto, la inexistencia de un agente que garantice la desinfección actuando selectiva, simultáneamente y que además ofrezca protección a los tejidos periapicales, hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para la terapia de conductos. La administración de  $\delta$ -ALA ofrece la inducción de la formación de fotoporfirinas endógenas que actuarán reactivamente sobre la membrana bacteriana. La administración exógena  $\delta$ -ALA podría ser una alternativa para la eliminación del “biofilm” intrarradicular y más significativa sería su acción sobre el biofilm extrarradicular para el cual actualmente no existe un agente bactericida capaz de eliminarlo sin producir irritación a los tejidos periapicales.<sup>59</sup>

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar *in vitro* el efecto bactericida de PpIX inducida por la administración exógena de  $\delta$ -ALA sobre biofilm de *E. faecalis*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la expresión y acumulación de PpIX por *E. faecalis* en por la administración exógena de  $\delta$ -ALA.
- Evaluar el efecto bactericida de la fotoactivación de PpIX inducida por la administración exógena de  $\delta$ -ALA en células planctónicas de *E. faecalis*.
- Inducir la formación dinámica de un biofilm (10 días) de *E. faecalis*.
- Determinar el efecto de la acumulación de la PpIX inducida por la administración de  $\delta$ -ALA sobre las células del biofilm de *E. faecalis*.

## 6. HIPÓTESIS

### **Hipótesis de trabajo (Hi)**

La administración exógena de  $\delta$ -ALA penetra la estructura tridimensional del biofilm llegando a las células blanco induciendo la formación de PpIX. La cual al ser fotoactivada por láser provocará la muerte celular y por consecuencia la destrucción del biofilm.

### **Hipótesis nula (Ho)**

La administración exógena de  $\delta$ -ALA no penetra la estructura tridimensional del biofilm llegando a las células blanco induciendo la formación de PpIX. La cual al ser fotoactivada por láser provocará la muerte celular y por consecuencia la destrucción del biofilm.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de realización

Este trabajo fue realizado en el posgrado de endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa en colaboración con el Laboratorio de Ciencias Básicas e Ingeniería Tisular de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

### 7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

- Experimental *in vitro*.

### 7.2 Definición conceptual y operacional de las variables

#### 7.2.1 Variable independiente

**Definición conceptual:** ácido aminolevulínico fotosensibilizador ( $\delta$ -ALA).

**Definición conceptual:** Joule es el trabajo producido por una fuerza de un newton, cuyo punto de aplicación se desplaza un metro en la dirección de la fuerza.

**Dosis láser definición conceptual:** la fórmula para dosificar el láser se basa en la cantidad de energía que recibe el organismo por unidad de superficie (DOSIS en Joule (J)  $J/cm^2$ ).

**Definición operacional:** la administración exógena de  $\delta$ -ALA más la fotosensibilización con láser de 532 nm durante un tiempo de 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J. Se usaron concentraciones 40  $\mu g/ml$

y 80 µg/ml de  $\delta$ -ALA sobre un inóculo  $5 \times 10^7$  cel./ml y biofilm elaborado a partir de una concentración  $5 \times 10^7$  cel./ml.

### 7.2.2 Variable dependiente

**Definición conceptual:** viabilidad celular. La viabilidad celular se refiere a la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular.

**Definición operacional:** la viabilidad celular se evaluó después de la administración exógena de  $\delta$ -ALA que indujo la formación y acumulación de PpIX que fotoactivada actúa como bactericida de las células del biofilm de *E. faecalis*.

### Materiales

#### Medios de cultivo

- 20 tubos de 10 ml /tapa con rosca de Tioglicolato (ver anexo 3)
- 50 cajas de petri de Agar sangre de carnero (ver anexo 4)

#### Materiales de laboratorio

- Microplacas multipozos de poliestireno de 24 pocillos de 3.5 mm
- Asas de vidrio
- Tubos eppendorf® de 1.5 y 2 ml
- Solución estéril PBS (solución tamponada de fosfatos ) 1X
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro de 2 ml.

## Equipo

- Espectrofluorometro PTI Photon Technology International mod. 5020
- Microscopio invertido confocal (DMI4000B Leica® MICROSYSTEMS Germany) con epifluorescencia.
- LAS AF software by DMI4000B Leica® MICROSYSTEMS Germany con epifluorescencia.
- Microscopio óptico (DMI4000B Leica® MICROSYSTEMS Germany)
- Láser de argón tipo 3 B de 500 mV (532 nm) del Microscopio Confocal DMI4000B Leica® MICROSYSTEMS Germany
- Agitador orbitario Glas-Col® Terre Haute IN , USA
- Incubadora PRECISION Thermo ELECTRON CORPORATION©
- Balanza analítica Adventurer™ de OHAUS®
- Multipipette® plus by eppendorf®
- Centrifuge eppendorf® 5810R Gekühlte Tischzentrifuge, max. Beladung 4x400 ml mit drehzahlregenlug bis 14.000 1/min onhe rotor
- Fotodocumentador, Bio-Rad Laboratories -Quantity One® Windows and Macintosh U.S.
- Espectrofotómetro Modern Science modelo 7552

### 7.3 Métodos

Este estudio fue dividido en 3 fases en base a los objetivos propuestos:

**Primera fase:** a) Cepa y condiciones de crecimiento, b) Disolución de  $\delta$ -ALA, c) Detección de Protoporfirina IX endógena, d) Determinación de la fotosensibilización de la PpIX expresada.

**Segunda fase:** Efecto bactericida de la PpIX fotoactivada sobre *E. faecalis*.

**Tercera fase:** a) Elaboración de biofilm, b) Administración de  $\delta$ -ALA sobre biofilm de *E. faecalis*, c) Ensayo de viabilidad celular.

#### Fase 1

##### a) Cepa y condiciones de crecimiento

El *E. faecalis* fue aislado de órganos dentales con fracaso de tratamiento endodóntico y lesión periapical persistente, de acuerdo al protocolo descrito Manzur y cols. (2006)<sup>60</sup> (ver anexo 1).

Para obtener un cultivo bacteriano de *E. faecalis* puro, se procedió a mantener la cepa viva con cultivos en agar sangre de carnero cada 24 horas para mantener las colonias bacterianas jóvenes, manteniéndolos a 37°C en una incubadora PRECISION, Thermo ELECTRON CORPORATION by THELCO.

##### b) Disolución de $\delta$ -ALA

Se elaboró preparando una dilución  $\delta$ -ALA sintetizado en el Laboratorio de Citopatología Ambiental, Depto. de Morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN a una concentración inicial de .5 mg de  $\delta$ -ALA en 100  $\mu$ l de tioglicolato = 5 mg/ml .Se prepararon 1,199.04 ml de tioglicolato enriquecido con vitamina k, se agregaron 96  $\mu$ l de la solución de  $\delta$ -ALA inicial obteniendo 12 ml de tioglicolato con una concentración de  $\delta$ -ALA 40  $\mu$ g / ml. Se mantuvo a 4°C y protegido de la luz por un periodo no mayor a 12 h después de su reincorporación.

### **C) Detección de Protoporfirina IX endógena**

La detección de la Pp IX inducida por la administración exógena de  $\delta$ -ALA se realizó mediante la formación de muestras con  $\delta$ -ALA-inoculo de 2 ml cada uno a una concentración de 40  $\mu$ g / ml y  $5 \times 10^7$  cel. /ml. Las muestras se mantuvieron en incubación durante 60 min en movimiento constante.

La extracción del contenido celular, después de que las muestras fueron llevadas a centrifugación 5000 rpm por 12 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 1 ml de PBS (solución salina tamponada en fosfatos), se centrifugó por segunda vez a 5000 rpm durante 5 min se agregó 1 ml de disolución rompedora (etanol, dimetil sulfoxido (DMSO) ácido acético (80:20:1 v/v/v), posterior a la centrifugación se sónico durante 5 s continuos por 5 ciclos a 0°C,

se centrifugó nuevamente durante 3 min a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante de la pastilla celular.<sup>61</sup>

El sobrenadante se transfirió a cubetas de cuarzo y fueron llevadas al espectrofluorómetro a una excitación de 375 nm en un barrido de 300 a 700 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **d) Determinación de la fotosensibilización de la PpIX expresada.**

Una vez realizada la lectura al espectrofluorómetro, estas mismas muestras se irradiaron con el láser de 532 nm del Microscopio Confocal DMI4000B Leica® MICROSYSTEMS Germany durante 2 min 8 s hasta alcanzar la dosis de 50 J de acuerdo con la fórmula dosis/potencia/superficie predeterminado (ver anexo).

### **Fase 2**

#### **Efecto bactericida de la PpIX fotoactivada sobre *E. faecalis***

El efecto bactericida de la PpIX activada se obtuvo mediante la formación de 4 grupos experimentales, los cuales fueron:

**Grupo 1** 2 ml *E. faecalis* a una concentración de  $5 \times 10^7$  cel./ml se añadió 1 ml NaOCl al 5.25%.

**Grupo 2** 2 ml de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel./ml

**Grupo 3** 2 ml de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel./ml se añadieron 40  $\mu$ g  $\beta$ -ALA

**Grupo 4** 2 ml de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel. /ml se añadieron 40  $\mu\text{g}$   $\beta$ -ALA y se irradiaron con un láser de 532 nm durante 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J.

Se tomaron 2 ml de cada muestra para hacer una disolución 1:10,000. Se tomó 100  $\mu\text{l}$  de la disolución para cultivar sobre agar gelosa sangre con técnica de extensión por asada en L, y se repitió el procedimiento a los 24 y 72 h.

### **Fase 3**

#### **Formación de Biofilm de *E. faecalis***

##### **a) Formación de biofilm maduro en placas multipozos de poliestrileno.**

Para la formación de biofilm en placas multipozos de fondo plano estériles se siguieron los protocolos descritos por Djordjevic y cols. (2002), Kaplan y cols. (2004). Los procedimientos se realizaron por triplicado.<sup>62-64</sup>

En los pozos de poliestrileno se colocó en el fondo de cada uno, cubreobjetos circulares de vidrio de 10 mm, se añadieron 71  $\mu\text{l}$  de inóculo de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel. /ml y 929  $\mu\text{l}$  en tioglicolato enriquecido con vitamina K, las muestras se incubaron durante 24 h, en movimiento constante sobre un agitador orbitario a 37°C. Transcurridas las 24 h de incubación se retiraron 700  $\mu\text{l}$  de cada muestra, y se añadieron 700  $\mu\text{l}$

de tioglicolato enriquecido con vitamina k, este procedimiento se realizó cada 24 h durante 10 días.

**b) Disolución de  $\beta$ -ALA para *E. faecalis* de biofilm maduro.**

Se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml .6 mg de  $\beta$ -ALA y 100  $\mu$ l de tioglicolato enriquecido con vitamina K, lo cual se mezcló en 5,9 ml de tioglicolato enriquecido con vitamina K, para obtener 6 ml a una concentración de 80  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -ALA.

**Grupos experimentales de biofilm maduro de *E. faecalis***

La evaluación bactericida de PpIX fotoactivada sobre biofilm maduro de *E. faecalis* se realizó formando cuatro grupos experimentales los cuales fueron:

**Grupo 1** control positivo se mezclaron 200  $\mu$ l de NaOCl al 5.25% más 800  $\mu$ l de tioglicolato.

**Grupo 2** se añadió 1 ml de tioglicolato y se aplicó láser 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J.

**Grupo 3** se colocó 1 ml de  $\beta$ -ALA-tioglicolato 80  $\mu$ g/ml.

**Grupo 4** se añadieron 1 ml de  $\beta$ -ALA-tioglicolato 80  $\mu$ g/ml y se irradió durante 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J.

Las muestras se mantuvieron en incubación durante 12 h en la cámara de cultivo en movimiento constante y protegidos de la luz.

Posteriormente se realizó un ensayo de viabilidad celular para evaluar el efecto bactericida de PpIX fotoactivada sobre *E. faecalis* de biofilm de 10 días.

### **c) Ensayo de viabilidad celular.**

Para realizar el ensayo de viabilidad bacteriana se retiró con una pipeta Pasteur el medio de cultivo de cada pozo, para eliminar las células no adherentes, cada portaobjetos fue colocado en una caja nueva y estéril multipozos de poliestileno, bajo condiciones de esterilidad, el biofilm formado se cubrió con 200 µl de CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl cloruro de tetrazolio) y se incubó durante 12h a 37° C en agitación constante, transcurrido este periodo se retiraron los 200 µl de CTC y se lavaron con 1 ml de PBS 1X se retiró el PBS, y el biofilm se cubrió con 200 µl de ioduro de propidio (PI). Permaneció en incubación durante 4 h, cada muestras se lavó con 1 ml de PBS se retiró el sobrenadante.

Finalmente se colocaron sobre un porta objetos para ser observado al microscopio confocal. Se utilizó el láser de excitación de 488 nm y una ventana de emisión de 500-520 nm para PI y un láser de excitación de 488 nm y una ventana de emisión de 600 a 630 nm para CTC.<sup>65</sup>

### **Tratamiento estadístico de los datos**

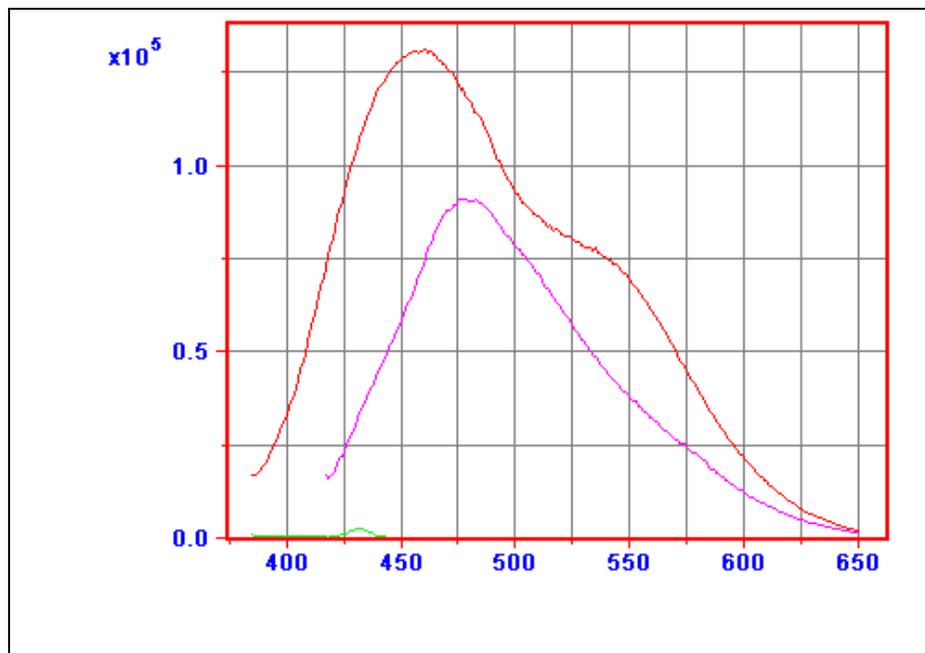
Para el tratamiento estadístico de los datos se empleó Jmp In ver 4.0.1 software. Se utilizó Kruskal-Wallis para datos no paramétricos y para saber el origen de las diferencias se utilizó U de Mann Whitney.

## 8. RESULTADOS

### Fase 1

#### Detección de protoporfirina IX endógena

Una vez realizada la extracción del contenido celular por el rompimiento de la membrana bacteriana, el sobrenadante fue llevado al espectrofluorómetro para su evaluación. El barrido se realizó en un espectro de 300 a 700 nm a una longitud de onda de 375 nm de excitación la cual se obtuvo después de haber hecho un barrido de 300 a 700 nm de absorbancia. Se llevaron a cabo el barrido de 3 diferentes muestras: 1. Inóculo de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel. /ml, con 40  $\mu\text{g/ml}$  de  $\delta$ -ALA (color rojo fig. 2), 2. Inóculo de *E. faecalis*  $5 \times 10^7$  cel. /ml con 40  $\mu\text{g/ml}$  de  $\delta$ -ALA e irradiación láser 532 nm y 2 min 08 s para una dosis de 50 J (color violeta fig. 2), 3. 2 ml de solución rompedora como blanco (color verde fig. 2)

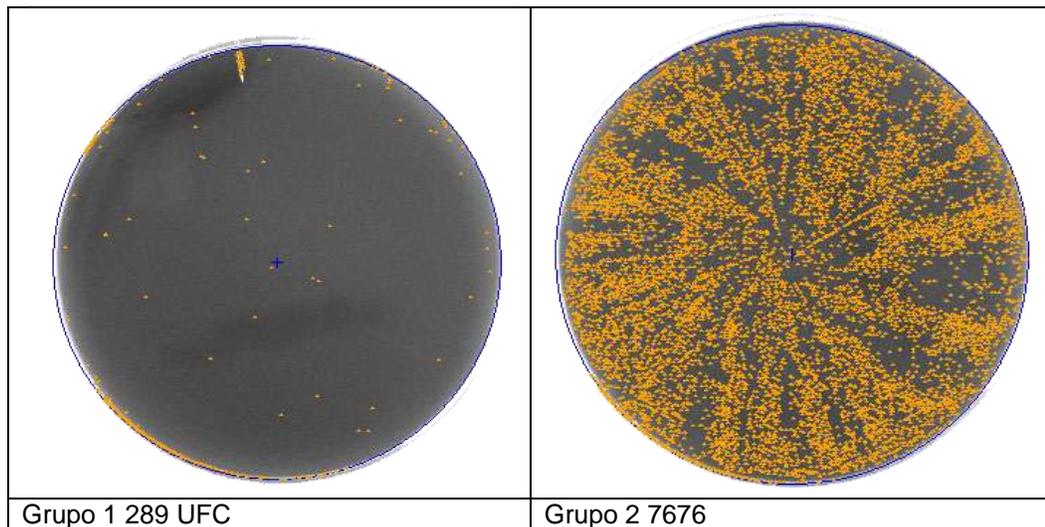


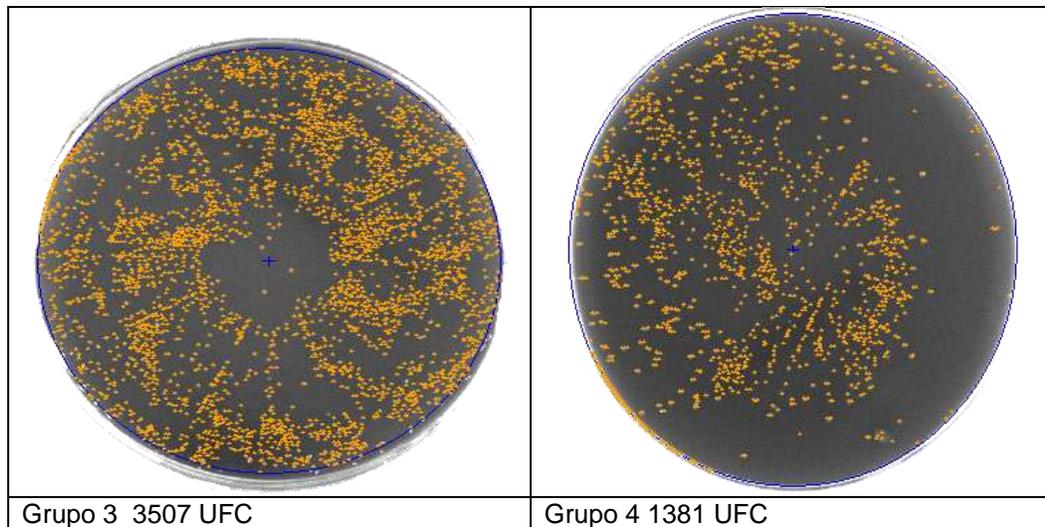
**Figura 2.** En la figura 2 se muestra en rojo el espectro de PpIX, en violeta se observa la muestra el espectro de PpIX después de ser irradiada con 50J y color verde se observa la solución rompedora como blanco.

En el espectro de emisión muestra la presencia de PpIX en los 460 nm y su fotoactivación, luego de ser irradiada con el láser a 532 nm se observó la disminución de la PpIX en el pico del espectro a 480 nm, debido a la inactivación de la protoporfirina por la irradiación láser.

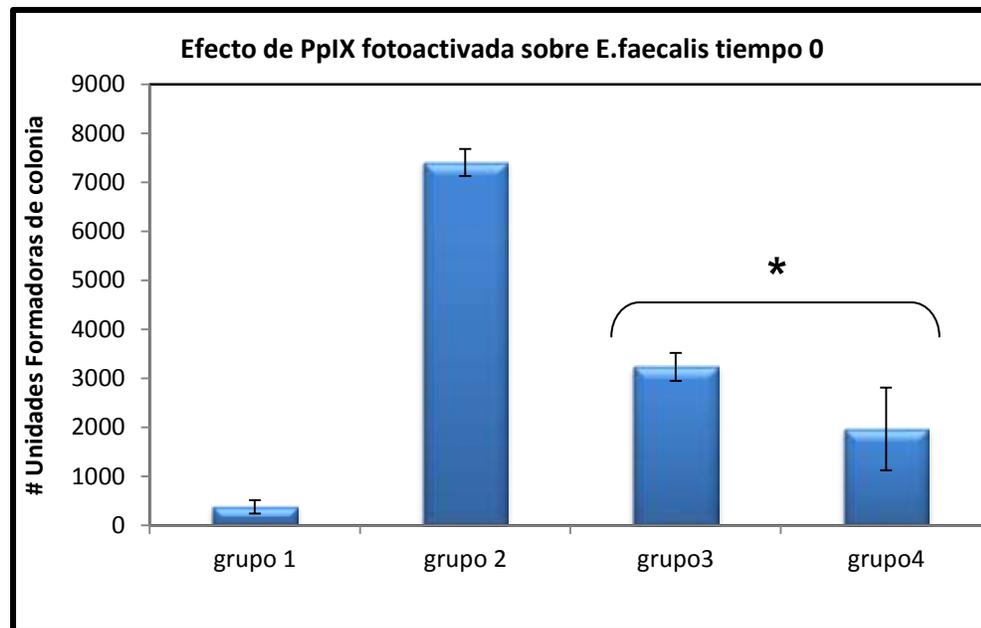
**Efecto bactericida de la PpIX fotoactivada sobre *E. faecalis*.**

De cada una de las muestras se realizó un cultivo por extensión con asada en L a una dilución de 1:10,000 partiendo de una concentración de  $1 \times 10^7$  en solución tamponada de fosfatos (PBS), este cultivo se hizo a tres diferentes tiempos T=0h- T=24h y T=72h. En la fig. 3 se muestran los resultados obtenidos del tiempo 0 h, donde se observa la disminución de las UFC en el grupo 4 con respecto a los controles grupo 1 y 2, en el grupo 3 se observa un crecimiento similar al del grupo 2.





**Figura 3.** En la figura se muestran las imágenes del fotodocumentador Bio-Rad de Quantity One software mostrando en amarillo las UFC de cada uno de los grupos al tiempo 0h. Se observa la disminución de las UFC en el grupo 4 con respecto a los controles grupo 1 y 2, en el grupo 3 se observa un crecimiento similar al del grupo 2.



**Grafico 1.** El grafico 1 muestra los cuatro grupos experimentales al tiempo cero de los resultados del efecto bactericida de PpIX fotoactivada sobre *E. faecalis*.

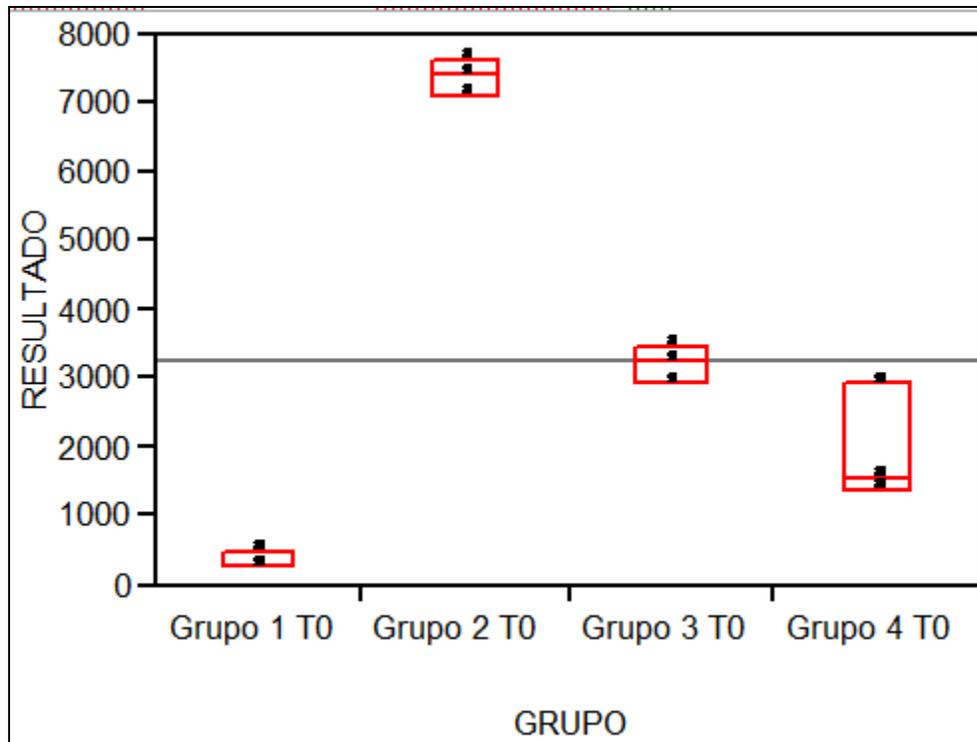


Gráfico 2. El gráfico muestra la distribución de los grupos experimentales de PpIX fotoactivada, mostrada en UFC y tiempo, T0h.

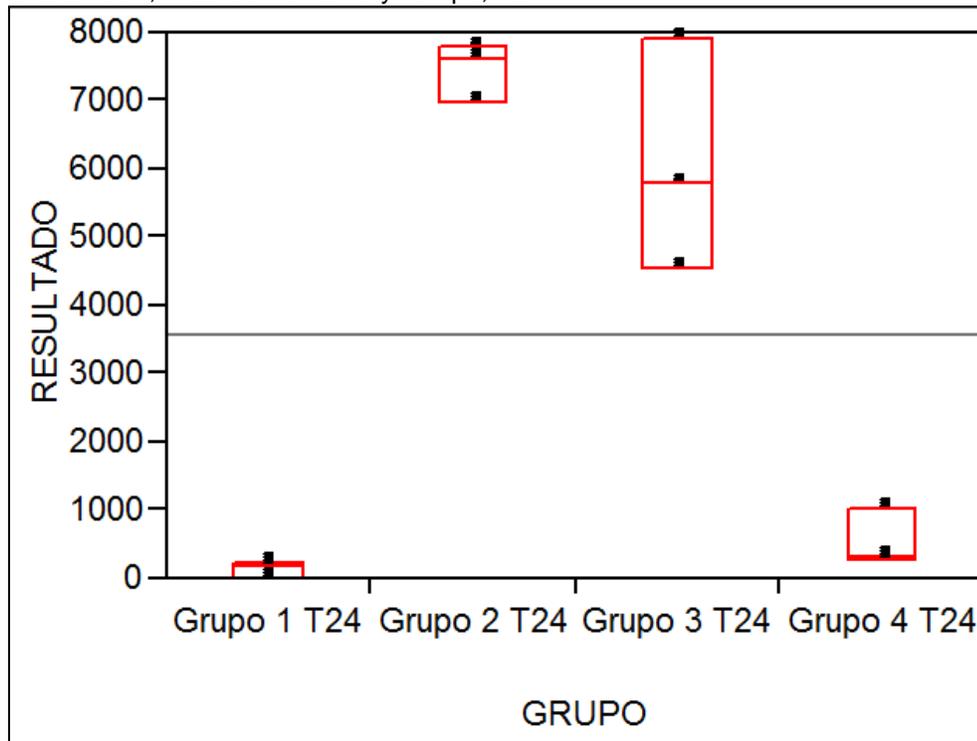


Gráfico 3. El gráfico muestra la distribución de los grupos experimentales de PpIX fotoactivada, mostrada en UFC y tiempo, T24h.

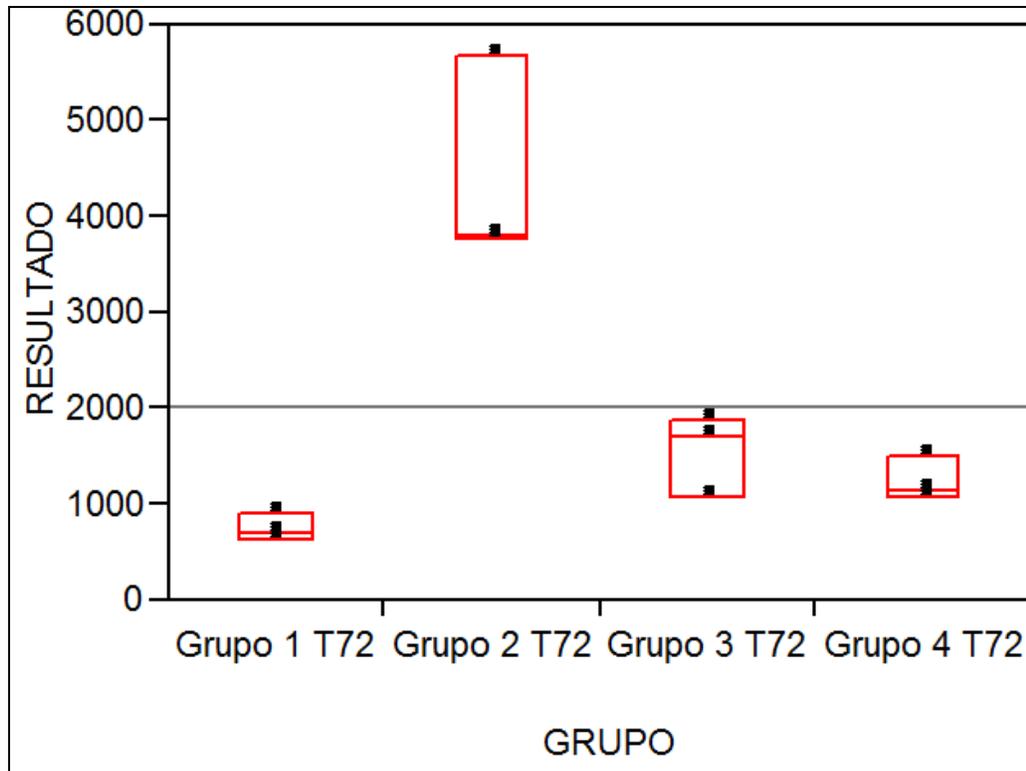
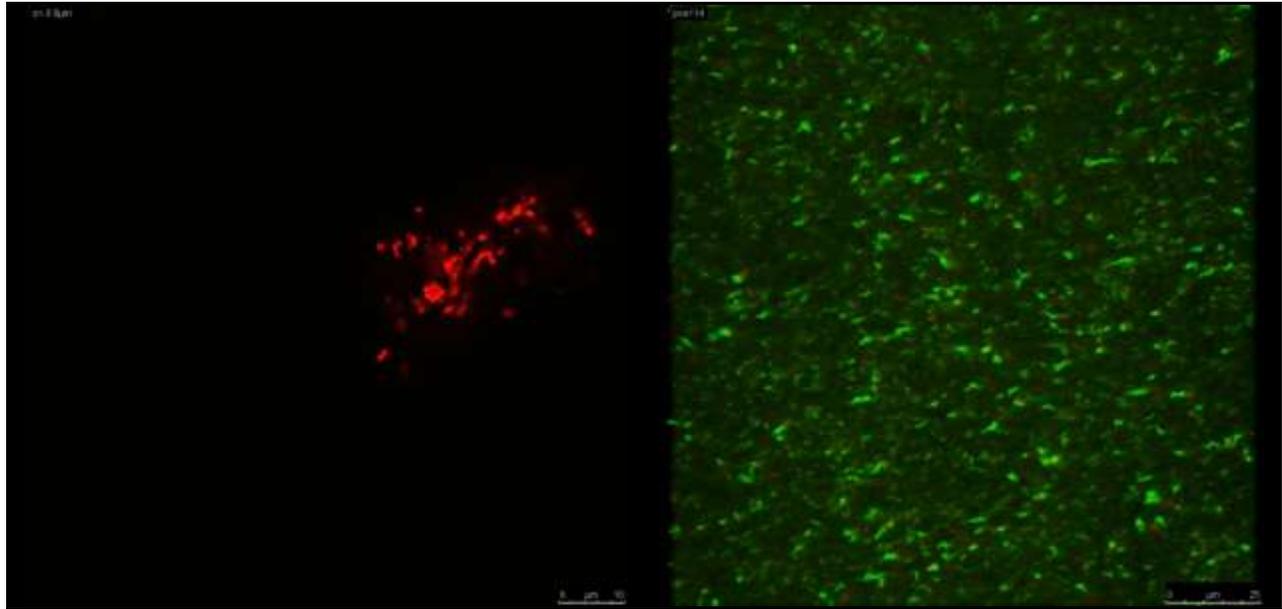


Gráfico 4. El gráfico muestra la distribución de los grupos experimentales de PpIX fotoactivada, mostrada en UFC y tiempo, T72h.

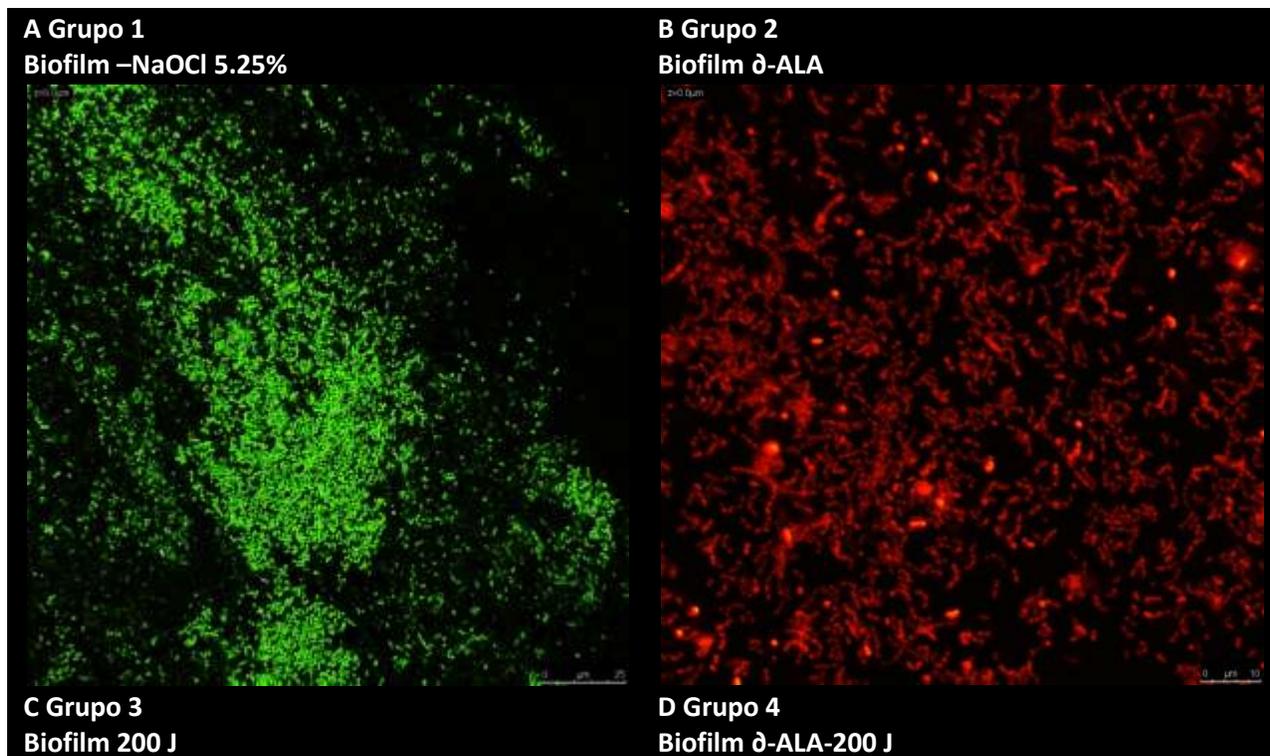
Tiempo 0h	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1
Grupo 2 T0		*	*	*
Grupo 3 T0	*		*	*
Grupo 4 T0	*	*		*
Grupo 1 T0	*	*	*	
<b>Tiempo 24h</b>				
Grupo 2			*	*
Grupo 3			*	*
Grupo 4	*	*		
Grupo 1	*	*		
<b>Tiempo 72 h</b>				
Grupo 2		*	*	*
Grupo 3	*			
Grupo 4	*			
Grupo 1	*			

Tabla 1. La tabla uno muestra los grupos con diferencia estadísticamente significativa a los diferentes periodos de tiempo.  $P < 0.05$

### Elaboración de biofilm a partir de *E. faecalis*



Se formó biofilm a partir de *E. faecalis* partiendo de una concentración  $5 \times 10^7$  cel./ml con una absorbancia de 566-601 nm, el medio de cultivo se cambió cada 24h durante 10 días para formar biofilm maduro; los grupos experimentales de biofilm fueron: **Grupo 1** control positivo se mezclaron 200  $\mu$ l de NaOCl al 5.25% más 800  $\mu$ l de tioglicolato. **Grupo 2** se añadió 1 ml de tioglicolato y se aplicó láser 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J. **Grupo 3** se colocó 1 ml de  $\beta$ -ALA-tioglicolato 80  $\mu$ g/ml. **Grupo 4** se añadieron 1 ml de  $\beta$ -ALA-tioglicolato 80  $\mu$ g/ml y se irradió durante 8 min 33 s para obtener una dosis de 200 J. Los cuales se muestran en imágenes de microscopía confocal de la figura 3.



**Figura 4.** Se muestran los 4 grupos experimentales de biofilm, imágenes representativas de microscopía confocal después de una ensayo de viabilidad bacteriana con CTC Y PI .En la imagen A se observa el grupo 1 tomada como control positivo donde se añadieron 2 ml de NaOCl 5.25% se observa en color rojo las células no viables. En la imagen B se muestra en color verde las células que después de 12 h de incubación con  $\delta$ -ALA se mantuvieron viables. En la imagen C se muestra en color verde las células viables después de la administración de una dosis de 200 J. En la imagen D se muestra en verde las células que mantuvieron viabilidad después de la administración de 80  $\mu$ g/ml de  $\delta$ -ALA y en rojo las células no viables.

## 9. DISCUSIÓN

Dadas las características de *E. faecalis*, su capacidad de formar biofilm y la resistencia que este le confiere a los diferentes antibióticos, agentes bactericidas, su capacidad de adaptación y su presencia dentro del sistema de conductos. Aunado a las evidencias científicas que soportan la presencia de biofilm en la superficie externa de la raíz;<sup>25, 43,44</sup> dichas características se les ha atribuido ser las principales causas de fracaso endodóntico y lesión periapical persistente. En este contexto, al referirnos a las condiciones de inexistencia de un agente que

garantice la desinfección completa del sistema de conductos, actuando como bactericida de manera selectiva y que simultáneamente ofrezca protección a los tejidos periapicales, lo que llevó a la realización del presente estudio. Esta investigación propone que el  $\delta$ -ALA penetra la estructura tridimensional de biofilm de *E. faecalis* llegando a las células bacterianas induciendo así la acumulación endógena de la Porphirina IX que fotoactivada es capaz de provocar la muerte celular bacteriana y la consecuente disgregación del biofilm.

Como se ha mencionado, la eficacia de los antibióticos se basan en modelos de cultivo planctónico, sin embargo estas pruebas suelen ser eficaces en este tipo de modelos sin embargo, en condiciones clínicas y en presencia de biofilm no logran la misma efectividad. En pruebas de susceptibilidad *in vitro* se ha demostrado una diferencia de entre 100 y 1000 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cultivos planctónicos y biofilm respectivamente. Abdullah y cols. (2005), demostró que *E. faecalis* en biofilm fue más resistente a la yodopovidona y a la clorhexidina (CHX) que la misma sepa en cultivos planctónicos.<sup>7</sup>

De acuerdo con J. Pottier, quien (1992) estableció, que el acumulo de protoporfirina producida endógenamente por las células es inducida por la administración exógena de 5-ALA, en el presente estudio se utilizó el espectrofluorometro para comprobar la presencia de protoporfirina IX en las células bacterianas, después de administrar  $\delta$ -ALA al inoculo con *E.*

*faecalis* siguiendo así los protocolos de incubación y extracción reportados por C.Brigido.<sup>61</sup>

En la actualidad, los estudios enfocados en la utilización de la PDT encontramos que, los experimentos se realizaron sobre bacterias planctónicas, en los cuales no se presentan las condiciones clínicas de infección de los conductos radiculares, donde la bacteria se asocia y adhiere a la pared dentinaria formando un biofilm. Por tal motivo, en este estudio se procedió a la formación de biofilm en placas de poliestireno, en un medio de cultivo de tioglicolato a una temperatura de 37° C. En el 2007 J. Duggan, no encontró diferencia significativa entre la capacidad de formación de biofilm de *E. faecalis* extraído de los conductos radiculares infectados y una sepa no extraída de la cavidad oral,<sup>17</sup> lo cual corrobora que la formación de biofilm por *E. faecalis* puede formarse *in vitro*. Dicho esto, en el presente estudio se realizó la formación de biofilm *in vitro*. Lo que garantiza una estructura formada adecuadamente, semejante a la formada *in vivo*, lo cual respalda que los resultados obtenidos en esta experimentación son fiables para continuar con la investigación acerca de la alternativa de PDT y  $\beta$ -ALA como bactericida de biofilm de *E. faecalis*.

Se ha establecido previamente en diferentes publicaciones que la PDT tiene un efecto bactericida sobre diferentes células bacterianas.<sup>60,65</sup> En el 2008 L. Bergmans observó el efecto sobre diferentes bacterias como *E. nucleatum*, *E. faecalis* y *S. anginosus*, y encontró una clara

disminución en sus grupos experimentales con PDT a diferencia de los que usaba láser en ausencia de un fotosensibilizador, la utilización de terapia fotodinámica fue efectuada en células planctónicas donde resultó eficaz.<sup>66</sup> Sin embargo, en el biofilm tuvo una eficacia sustancialmente reducida y concluyo, que aunque PDT puede usarse como un complemento en los actuales protocolos de endodoncia, pero no como un tratamiento independiente. De igual manera en el presente estudio se comprobó que  $\delta$ -ALA en ausencia de irradiación no tiene un efecto bactericida sobre *E. faecalis*.

Por otro lado, se comprobó que  $\delta$ -ALA fotosensibilizado actúa como un eficaz bactericida sobre células de biofilm maduro de *E. faecalis*, sin la necesidad de la disrupción previa de este.

Diversos estudios han demostrado que el hipoclorito de sodio (NaOCl) utilizado en sus diferentes concentraciones es un excelente bactericida, con la ayuda de aditamentos y técnicas específicas para irrigación se ha mencionado como el más conocido y utilizado<sup>18, 21,23</sup> desde su introducción a endodoncia en 1936 por Walker. El NaOCl es efectivo por una de sus mejores propiedades, que es la capacidad de disolver tejido orgánico, dependiente de su concentración<sup>53</sup>. Sin embargo, otra característica de esta sustancia, que también es dependiente de la concentración es la citotoxicidad, solo por hacer mención.<sup>58</sup> En acuerdo

a estas aseveraciones en la presente investigación se corroboró, que el NaOCl es un efectivo bactericida así como un disolvente del componente orgánico del biofilm de *E. faecalis*. El  $\beta$ -ALA-PDT actuó de la misma manera, como un eficaz bactericida, penetrando la estructura de biofilm y eliminando el 100% de las células bacterianas en el biofilm maduro de *E. faecalis* aun, sin la disrupción previa de la estructura de biofilm.

## 10. CONCLUSIÓN

La administración exógena  $\delta$ -ALA penetró la estructura tridimensional del biofilm llegando a las células blanco, induciendo la formación de PpIX; la cual fotoactivada por láser de argón de 532 nm tipo 3 B de 500 mV provoca la muerte celular bacteriana, sin necesidad de la disrupción previa del biofilm.

### Perspectivas

Se abre una nueva línea de investigación para la eliminación de biofilm utilizando terapia fotodinámica (PAD).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. **The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats.** Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology 1965;20; 340–9.
2. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. **Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis.** International Endodontic Journal 1997;30; 297–306.
3. Vertucci FJ. **Root canal anatomy of the human permanent teeth.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1984; 58:589-99.
4. Nair PNR. **Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions.** Journal of Endodontics 1987; 13; 29–39.
5. Siqueira JF Jr, Rocas IN. **Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107:870-8.
6. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. **In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms.** Int Endod J 2006; 39:878-85.
7. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. **Susceptibilities of two Enterococcus faecalis phenotypes to root canal medications.** J Endod 2005; 31:30-6.
8. Van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. **The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies.** Int Endod J 2007;40:52-7
9. Moan J and Peng Q: **An outline of the hundred-year history of PDT.** Anticancer Res. 23: 3591-600, 2003 Ortel B, Shea CR and Calzavara-Pinton P: **Molecular mechanisms of photodynamic therapy.** Front Biosci. 14:4157-72, 2009.
10. Ortel B, Shea CR and Calzavara-Pinton P. **Molecular mechanisms of photodynamic therapy.** Front Biosci. 14:4157-72, 2009.
11. Donlan Rodney M. **Biofilm: survival Mechanisms of clinically Revelant Microorganisms.** Clin Microbiol Rev 2002;15:167-193
12. Costerton J.W. **Biofilm the custumice microniche.** J of Bacteriol 1994;176:2137-2142
13. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. **Biofilm formation in medicated root canals.** J Endod 2002; 28:689-93.
14. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. **Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic**

- treatment.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics 2005; 99; 231–52.
15. Fleming Hans-curt. The EPS Matrix: **The “House of Biofilm Cell”.** J Bacteriol 2007; 189:7945-7947.
  16. Parsek M. Biofilm 2003: **Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life .**J Bacteriol 2004;186:4427-4440
  17. Duggan JM, Sedgley CM. **Biofilm formation of oral and endodontic enterococcus faecalis.** J Endod 2007;33:815-8.
  18. Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. **Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono - and dual- species biofilms of Fusobacterium nucleatum and Peptostreptococcus (micromonas) micros.** J Endod 2007; 33:819-22.
  19. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Alves FR, Silva MG. **Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107:721-6.
  20. Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Tsesis I, Weiss EI. **Characterization of coaggregation of Fusobacterium nucleatum PK1594 with six Porphyromonas gingivalis strains.** J Endod 2009; 35:50-4.
  21. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. **In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms.** Int EndodJ 2006; 39:878-85.
  22. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. **Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis.** Int Endod J 1998; 31: 1–7.
  23. Van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. **The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies.** Int Endod J 2007; 40:52-7.
  24. George S, Kishen A, Song KP. **The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis.** J Endod 2005; 31:867-72.
  25. Leonardo M, Rossi M., Silva L., Ito I., PhD, Bonifacio K., **Evaluation of Bacterial Biofilm and Microorganisms on the Apical External Root Surface of Human Teeth.** J Endod 2002;28;12 815-8
  26. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. **Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms.** Int Endod J 2007; 40:344-55.
  27. Svensater G, Bergenholtz G. **Biofilms in endodontic infections.** Endod Topics 2004; 9:27-36.
  28. J.F. Siqueira Jr .**Microbial causes of endodontic flare-ups Review.** Int Endod J 2003;36:453-463

29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science 1999; 284(5418):1318-22.
30. I .T.Paulsen .**Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*** Science 299; 5615:2071-2074, 2003
31. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. **Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro.** Int Endod J 1997; 30:279–82.
32. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. **Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85: 86–93.
33. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. **Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases.** J Endod 2004; 30:315–20.
34. Chávez L. **Gram-positive organisms in endodontic infections.** Endod topics 2004, 9, 79–96
35. H.-A. Elsner, I. Sobottka, D. Mack, M. Claussen, R. Laufs, R. **Wirth Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2000) 19:39–42
36. De la Maza, Luis M., Marie T. Pezzlo, and Janet T. Shigei. **Color Atlas of Medical Bacteriology.** Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2004 Gilmore, Michael. **The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.** Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2002
37. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, DA Garsin, M Höök, SL Erlandsen, Murray SER. **La endocarditis y la biopelícula asociada pili de *Enterococcus faecalis*.** "The Journal of Clinical Investigation. Octubre de 2006. N ° 116. P2799-2807z
38. Tronstad L, Andreasen J, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. **pH changes in dental tissues after root filling with calcium hydroxide.** J Endod 1981;7:17–21
39. Tronstad L, Andreasen J, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. **pH changes in dental tissues after root filling with calcium hydroxide.** J Endod 1981; 7:17–21.
40. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. **Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes.** J Endod 2004;30:209-12
41. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. **Prevalence, phenotype, and genotype of oral *Enterococci*.** Oral Microbiol Immunol 2004; 19:95–101.

42. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. **Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility.** Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 100-3
43. Noiri Y, Ehara A., Kawahara T., DDS, Takemura N., and Ebisu S. **Participation of Bacterial Biofilms in Refractory and Chronic Periapical Periodontitis.** J endod 200; 28:679-683.
44. Siqueira J. **Microbial causes of endodontics flare-up.** Int End J 2003; 36:453-463.
45. Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. **Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection.** Int Endod J 2006; 39:343-56.82.
46. Ackroyd R, Kelty C, Brown N and Reed M: **The history of photodetection and photodynamic therapy.** Photochem Photobiol. 74: 656-69, 2001.
47. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S and Chandrashekar T. **Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers.** Curr Med Chem Anticancer Agents. 2:187-207, 2002.
48. Wainwright M: **Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers.** AnticancerAgents Med Chem. 8: 280-91, 2008
49. J. Kennedy, H.Pottier. **Edogenous protoporphyrin IX, a clinically use photosensitizer for photodynamic therapy.**J Photochem Photobiol B. Biol,1992;14:275-292
50. Shemin D: **An illustration of the use of isotopes: the biosynthesis of porphyrins.** Bioessays. 10: 30-5, 1989.
51. Longhi G.,Guzzo J.,Mariano W., Dias de Oliveira S., and Poli de Figueiredo J.**Effect of Ultrasonics on Enterococcus faecalis Biofilm in a Bovine Tooth Model.** J Endod 2011; 37:1128–1133
52. De Paz LC. **Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities.** J Endod 2007; 33:652-62.
53. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. **Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections.** J Endod 2006; 32:312-8.
54. Walker A. **Definite and dependable therapy for pulpless teeth.** J Am Dent Assoc 1936; 23:1418–24.
55. Chavez de Paz L., Bergenholtz G., and Svensäter G. **The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria .**J Endod 2010; 36:70–77.
56. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. **Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals.** J Endod 2002; 28:181-4.

57. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. **Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections.** J Endod 2002; 28: 168–172.
58. Siqueira JF Jr, Rocas IN. **Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97: 85–94.
59. Kleier D., Averbach R., and Omid Mehdipour O. **The Sodium Hypochlorite Accident: Experience of Diplomates of the American Board of Endodontics.** J Endod 2008; 34:1346 – 1350.
60. Manzur A J. **Evaluación in vivo de los efectos de la preparación biomecánica y medicación intraconducto sobre los microorganismos de los conductos radiculares.** Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias con Especialidad en Endodoncia. Maestría en Endodoncia de la UASLP, México 2006.
61. C.Brigido, E.Ramón, F.Arenas, R.Uribe. **Induced Protoporphyrin IX accumulation by the  $\delta$ -Aminolevulinic Acid in Bacteria and its Potential Use in the Photodynamic Therapy.** *Lab. De Citopatología Ambiental. Departamento de Morfología, ENCB, Instituto Politécnico Nacional. Carpio y Plan de Ayala S/N. Col. Sto. Tomás. México, D.F. C.P. 11340. Corresponding author: [eramong@ipn.mx](mailto:eramong@ipn.mx)*
62. Djordjevic D. **Microtiter Plate Assay for Assessment of Listeria Monocytogenes Biofilm Formation.** Appl Environ Microbiol 2002, 2950-2958.
63. Kaplan J. **Enzymatic Detachment of Staphylococcus epidermis Biofilms.** Antimicrob. Agent Chemother 2004; 48:2633-2636.
64. Zaw M. **In vitro formation of Candida Albicans and non-albicans Candida species under dynamic and anaerobic conditions.** Archives of Oral Biology 2007; 52:761-767.
65. Zapata R., Bramante C., Gomes de Moraes I., Bernardineli N., Gasparoto T., † Graeff M., † Campanelli A., † Brandão R. **Confocal Laser Scanning Microscopy Is Appropriate to Detect Viability of Enterococcus faecalis in Infected Dentin.** J Endod 2008; 34:1198 –1201.
66. Fotinos N., Convert M., † Piffaretti JC., † Gurny R., and Lange N. **Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5 Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives.** ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2008, p. 1366–1373 Vol. 52, No. 4
67. L. Bergmans, P. Moisiadis, B. Huybrechts, B. Van Meerbeek<sup>1</sup>, M. Quirynen & P. Lambrechts. **Effect of photo-activated**

**disinfection on endodontic pathogens ex vivo.** Int Endod J, 41:227–239, 2008.

## **ANEXOS.**

### **ANEXO 1 Protocolo de desinfección Manzur Conte A.J. y cols.<sup>60</sup>**

1. Eliminación de caries, curaciones, restauraciones, etc. con pieza de alta velocidad.
2. Antes de encontrar la cámara pulpar se desinfecta el campo operatorio:

- a. Cubrir el techo de la cámara con una torunda de algodón estéril.
  - b. Desinfectar el campo operatorio con una torunda de algodón embebida en peróxido de hidrógeno al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) por un minuto.
  - c. Frotar el campo con una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% (NaOCl 5.25%) por un minuto.
  - d. Para inactivar las soluciones anteriores, frotar el campo con un algodón embebido en tiosulfato de sodio al 10% (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10%) durante un minuto.
3. La fresa se cambió por otra fresa nueva y estéril.
  4. El acceso a la gutapercha se termina irrigando con solución salina estéril, succionando con cánula estéril.
  5. Segunda etapa de desinfección:
    - a. Utilizando una torunda de algodón estéril embebida en peróxido de Hidrógeno al 30% se desinfecta nuevamente desde la cavidad de acceso, por todo el campo operatorio, durante un minuto.
    - b. Realizar el mismo procedimiento, con hipoclorito de sodio al 5.25% por otro minuto.
    - c. Inactivar las soluciones con tiosulfato de sodio al 10% tanto en la cámara pulpar, como en el campo operatorio, por un minuto.
  6. Este último procedimiento, se repitió por tercera ocasión.
  7. Tomar una muestra de la cámara pulpar y del campo operatorio con algodón estéril, enseguida se inocula en una placa de agar sangre, dentro del radio de 30 cm alrededor de una lámpara de alcohol encendida previamente. Esta se lleva a incubar en la estufa

bacteriológica, bajo condiciones de aerobiosis, a 35 +/- 2 °C, durante 24 h.

### **ANEXO 2 Protocolo de toma de muestra:**

La toma de muestra de obtiene del O.D., se utiliza para este procedimiento limas Protaper de Retratamiento (Dentsply) y limas Hedstrom 1ra serie (Dentsply, Maillefer), sin irrigación para no alterar las condiciones del conducto. Por medio de las limas Protaper de Retratamiento se obtuvo la gutapercha y se colocó en el medio de transporte de tioglicolato prerreducido enriquecido con vitamina K y hemina (BBL, Becton Dickinson de México S.A. de C.V.), se instrumentó con una lima Hedstrom ajustada a nivel apical, la totalidad de las paredes y se sembró, al igual que la lima Protaper de Retratamiento y la gutapercha en el medio de transporte de tioglicolato prerreducido enriquecido (BBL, Becton Dickinson de México S.A. de C.V.), al final se colocaron dos gotas de agua estéril las cuales se absorbieron con puntas de papel estériles y se colocaron en el mismo tubo.

El tubo de tioglicolato enriquecido (BBL, Becton Dickinson de México S.A. de C.V.) con las muestras, se incubó dentro de la cámara de anaerobiosis, en una atmosfera 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, a 33°C, durante 48 h.

### **Anexo 3 Manejo de $\delta$ -ALA**

El ácido aminolevulínico  $\delta$ -ALA en estado sólido se conservó a -20 grados protegido de la luz. Para ser usado se reconstituyo en el medio

de cultivo a una concentración de 80  $\mu\text{m}/\text{ml}$  a  $4^\circ\text{C}$  y protegido de la luz para su manejo,  $\delta$ -ALA reconstituido tiene un tiempo de vida útil de 12h.

#### **Anexo 4 Escala de Mc farland**

La utilidad de la escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez ya estamos en el 0,5 (de forma visual). La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Creamos 10 estándares (en la tabla aparece la composición de estos) y por espectrofotometría, creamos una recta patrón, de forma que vamos a poder detectar la concentración de nuestras diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria, la formación de agregados). La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico.

TUBO	$\text{Cl}_2\text{Ba}$ 1%	$\text{SO}_4\text{H}_2$ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
5	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$
6	0,6	9,4	$1,8 \times 10^9$
7	0,7	9,3	$2,1 \times 10^9$
8	0,8	9,2	$2,4 \times 10^9$
9	0,9	9,1	$2,7 \times 10^9$
10	1,0	9,0	$3,0 \times 10^9$

### **Anexo 3 Medio Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador enriquecido con hemina y vitamina.**

#### **USO**

Para cultivo de anaerobios obligados estrictos, obligados moderados, facultativos, aerotolerantes y microaerofílicos a partir de diversas muestras.

#### **PRINCIPIO**

La peptona de caseína proporciona la fuente de nitrógeno. El tioglicolato de sodio, la cistina y el sulfito de sodio son sustancias reductoras que proporcionan una atmósfera adecuada de anaerobiosis. La adición de vitamina K y hemina favorecen el desarrollo de este tipo de bacterias. Sembrar el material de prueba en el medio de cultivo hasta el fondo con asa o pipeta Pasteur de punta larga estéril. Es importante no agitar para evitar la oxigenación del medio. Agregar aceite mineral estéril para formar un tapón. Incubar de 48–72h a la temperatura óptima. Los microorganismos anaerobios se desarrollan en la parte inferior del medio de cultivo.

#### **FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA**

Agar 0.5

L-Cistina 0.4

Cloruro de sodio 2.5

Fosfato dipotásico 1.5

Hemina 0.005

Peptona de caseína 20.0

Sulfito de sodio 0.2

Tioglicolato de sodio 0.6

Vitamina K 0.001

pH 7.2 ± 0.2

### **Anexo 5 Agar gelosa sangre**

#### **USO**

Medio selectivo para la demostración y aislamiento a partir de diversas muestras.

#### **PRINCIPIO**

La peptona y el extracto de carne proporcionan la fuente de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos exigentes. La azida de sodio inhibe flora Gram negativa. La sangre de carnero se adiciona para enriquecer el medio y favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes. Este medio no es recomendable para diferenciar reacciones hemolíticas de los estreptococos a partir de exudados faríngeos, siendo de gran utilidad en muestras muy contaminadas con microorganismos Gram negativos por ejemplo heridas, etc. Aislar sobre la superficie del medio de cultivo por estría cruzada el material de prueba. Incubar 24 – 72 h a 35°C Efectuar pruebas de identificación bioquímica. Observar si hay halos de hemólisis.

#### **FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA**

Agar 15.0

Cloruro de sodio 5.0

Infusión de musculo Cardíaco 10.0

Peptona de carne 10.0

Sangre de carnero estéril desfibrinada 50.0

pH  $7.3 \pm 0.2$

### **Anexo 6 fórmula dosis superficie**

La fórmula para dosificar el láser se basa en la cantidad de energía que recibe el organismo por unidad de superficie (DOSIS en  $J/cm^2$ ) que depende de la potencia del equipo y de la superficie tratada. El tiempo de sesión obedece a las siguientes formulas:

**Dosis por superficie**  
 $T = \frac{\text{Dosis}}{W}$

**W** (potencia media)

Donde potencia media  $W_m = W_p \cdot t_p \cdot F_{Hz}$

Potencia media ( $W_m$ ) es igual a: potencia de pico  $W_p$  por el tiempo del pulso ( $t_p$ ) por frecuencia ( $F_{Hz}$ )