

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE
BIOPELÍCULA INTRA CONDUCTO DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS Y CANDIDA
ALBICANS**

No. de registro 2019-3

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

PRESENTA:

C.D. ALEXIS EMMANUEL GUARDADO PAREDES

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA

DR. ROSALIO RAMOS PAYAN

ASESORES DE TESIS:

M.C. ANA MARÍA GONZÁLEZ AMARO

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE DE 2019

DEDICATORIA

Este trabajo es gracias a mis padres Liliana y Juventino quienes me apoyaron en todos los aspectos, que sin ellos no hubiese sido posible culminar un estudio de posgrado, sin duda les quedo a deber mucho.

GRACIAS.

Alexis Emmanuel Guardado Paredes

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mis padres Juventino y Liliana por su apoyo brindado durante mi estancia de estudios de especialidad y antes de eso por formarme como una persona con metas y sueños por realizar.

A mis hermanos Sinay, Uriel y Liliana porque de una u otra forma fueron de gran apoyo durante estos dos años y medio en formación como especialista en endodoncia. Los quiero familia.

De igual manera agradezco al Posgrado en Endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa quien me permitió ser un estudiante de mencionada institución y poder formarme como Especialista en Endodoncia.

A mis directores de tesis el Dr. José Geovanni Romero por haberme compartido de sus conocimientos y dirigir el trabajo realizado, por la paciencia que mostró durante todo el trayecto y por su disposición a pesar de su agenda saturada. Al Dr. Rosalio Ramos por haberme abierto las puertas a su Laboratorio de Microbiología para realizar cada uno de los ensayos que se requerían y por asesorarme en cada duda que se presentaba.

A la Dra. Maribel Aguilar por brindarme las instalaciones de su Laboratorio de Inmunología y por aquellas clases para la comprensión de las enfermedades y las respuestas que nuestro cuerpo hace, por ello puedo decir que es una calidad de docente y sobre todo una gran persona.

A la Dra. Yolanda Castro primeramente por haberme abierto las puertas a pocos días de cerrarse la convocatoria de admisión al posgrado, por habernos apoyado cuando se requería. Al Dr. Alfredo Ayala por ser un pilar fundamental dentro del posgrado quien supo compartir sus conocimientos y darnos armas para saber

pensar, analizar y cuestionar sobre el área endodóntica y por habernos regalado un poco de su experiencia laboral.

A los titulares de clínica Dra. Erika Silva, Ilsa Insunza, Itzel Castro, Alfredo Ayala y Omar Cazares quienes cada día de clínica mostraron gran interés en apoyarnos en la solución de problemas presentes en cada uno de los pacientes que acudían a la clínica, siempre mostrando humildad en sus conocimientos y experiencia clínica.

A mis compañeros del posgrado por haberme apoyado cuando lo requería y por haber hecho tan divertido el posgrado donde hubo risas, lágrimas, enojo y sobre todo buenos momentos muchas gracias, colegas.

A la Maestría en Endodoncia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por haberme recibido en su clínica y Laboratorio de Microbiología a cargo de la Dra. Ana María González, enseñarme y apoyarme en el trabajo de tesis presente. De igual forma a la Dra. Verónica Méndez quien mostró atención y buen trato durante el intercambio académico realizado. A la Dra. Verónica Zavala por haberme asesorado durante el uso del microscopio electrónico de barrido.

A los alumnos de licenciatura, maestría y doctorado presentes en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, que me apoyaron durante la estancia en especial a Daniela y Mariana.

Y a las personas que faltaron de mencionar les doy las gracias por su apoyo brindado antes y durante la estancia en el posgrado, solo puedo decirle que de igual manera cuentan con mi apoyo gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ix
INDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1 MARCO TEÓRICO	6
1.1 Pulpa dental	6
1.1.1 Infección Pulpar	7
1.1.2 Bacterias en el Conducto Radicular	14
1.2 BIOPELÍCULA MICROBIANA	16
1.2.1 Formación de la biopelícula	18
1.2.2 Biopelículas en infecciones endodónticas	20
1.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	22
1.4 Formación de biopelícula de <i>Enterococcus faecalis</i>	24
1.5 <i>Candida albicans</i>	25
1.6 Formación de biopelícula de <i>Candida albicans</i>	30
1.7 Antecedentes	33
2 JUSTIFICACIÓN	35
3 OBJETIVOS	36

3.1	Objetivo General	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	METODOLOGÍA	37
4.1	Tipo de estudio	37
4.2	Determinación de la Biopelícula <i>in vitro</i>	37
4.2.1	Cepas de estudio	37
4.2.2	Preparación de las cepas de estudio	37
4.2.3	Ensayo de formación de biopelícula	38
4.2.4	Cuantificación de la Biopelícula	38
4.3	Formación de Biopelícula Ex vivo	44
4.4	Evaluación de la formación de la biopelícula mediante MEB.....	45
4.5	Diseño estadístico.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Resultados <i>In vitro</i> en la formación de biopelícula	50
5.2	Resultados <i>Ex Vivo</i> en la formación de biopelícula.....	56
6	DISCUSIÓN	70
7	CONCLUSIONES	73
8	PERSPECTIVAS.....	74
9	BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de desarrollo de biopelículas en bacterias, levaduras y hongos filamentosos.	20
Figura 2. Ciclo de vida de una biopelícula de <i>C. albicans</i>	32
Figura 3. Metodología para la formación y cuantificación de biopelículas.....	40
Figura 4. Microplaca de 96 pocillos con inoculación de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> en medio TSB, LB, TSB+EL y PDA.....	41
Figura 5. Microplaca de 96 pocillos con inoculación de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> en medio BHI, PDB Y BHI+PDB.	41
Figura 6. Fijación de la biopelícula con metanol al 99.98%.....	42
Figura 7. Microplaca de 96 pocillos teñida con cristal violeta	42
Figura 8. Microplaca de 96 pocillos con ácido acético al 33%.....	43
Figura 9. Análisis de la cepa madre mediante histomorfología de <i>C. albicans</i>	48
Figura 10. Análisis histomorfológico de la bacteria <i>Enterococos Faecalis</i>	49
Figura 11. Sobrenadante del cultivo de <i>E. Faecalis</i> a 21 días.....	56
Figura 12. Sobrenadante del cultivo de <i>Cándida albicans</i> a 21 días.....	57
Figura 13. Tinción de Gram de <i>C. albicans</i> y <i>E. faecalis</i> : a) 72 horas, b) 7 días y c) 21 días de incubación.	59
Figura 14. MEB del grupo control.....	61
Figura 15. <i>C. albicans</i> incubada a 7 días.	62
Figura 16 <i>E. faecalis</i> incubado a 7 días..	63

Figura 17. Biofilm mixto a 7 días.	64
Figura 18. Biopelícula madura de <i>C. albicans</i> a 21 días de incubación;	65
Figura 19. Biopelícula madura de <i>E. faecalis</i>	67
Figura 20. Biopelícula madura de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> a 21 días.	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> en dilución de medios de cultivo a 1.....	51
Gráfica 2. Crecimiento de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> en dilución de medio a 0.5... 52	
Gráfica 3. Crecimiento de <i>E. faecalis</i> a 48 horas.	53
Gráfica 4. Crecimiento de <i>C. albicans</i> a 48 horas.	54
Gráfica 5. Crecimiento de biopelícula con relación a la proporción de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i>	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de interpretación de la formación de biopelículas.....	43
--	----

RESUMEN

Introducción. La biopelícula es el sistema más común de organización microbiana, formados por uno o varios microorganismos unidos a una superficie viva o inerte. En ella, los microorganismos se envuelven en una matriz extracelular de polisacáridos con canales de agua internos y forman etapas de interacción entre los microorganismos y las células huésped, creando una comunidad metabólica que contribuye de manera compleja a la supervivencia del microorganismo. El proceso de formación de biopelículas en el canal de la raíz aún no se conoce bien. **Objetivo.** Establecer un modelo de biopelículas intraconductos. **Metodología.** Se cultivó *E. faecalis* y *C. albicans* en placas de 96 pocillos por 24 y 48 horas a 37 ° C. posterior se midió la absorbancia bajo el método de tinción con cristal violeta. En premolares humanos se prepararon bajo la técnica de Haapasalo (1989) y se sumergieron en tubos con 15 ml de medios de cultivo y se realizó la incubación de los microorganismos haciendo recambios cada 72 horas. Y los dientes fueron fijados y procesados para ser analizados con el MEB. **Resultados.** En el ensayo *in vitro* no hubo diferencia significativa en crecimiento de *E. faecalis* en los diferentes medios de cultivo comparado con *C. albicans* en el cual se observó un mejor crecimiento en infusión cerebro corazón + caldo dextrosa papa (BHI + PDB). En el ensayo *Ex vivo* se mostro una maduración de biopelícula compuesta por la bacteria y levadura en medio BHI+ PDB . **Conclusión.** La biopelícula tiene un crecimiento y maduración a 21 días en

incubación con flujo de medio. **Palabras clave:** biopelícula, *C. albicans*, *E. faecalis*, SEM.

ABSTRACT

Introduction. Biofilm is the most common system of microbial organization, formed by one or more microorganisms attached to a living or inert surface. In it, microorganisms are wrapped in an extracellular matrix of polysaccharides with internal water channels and form stages of interaction between microorganisms and host cells, creating a metabolic community that contributes in a complex way to the survival of the microorganism. The process of biofilm formation in the root canal is not yet well known. **Objective.** Establish a model of intraconductive biofilms. **Methodology.** *E. faecalis* and *C. albicans* were cultured in 96-well plates for 24 and 48 hours at 37 ° C. The absorbance was measured using the violet crystal staining method. In human premolars they were prepared under the technique of haapasalo and immersed in tubes with 15 ml of culture media and the incubation of the microorganisms was carried out making replacements every 72 hours. And the teeth were fixed and processed to be analyzed with the MEB. **Results.** In the *in vitro* test, there was no significant difference in growth of *E. faecalis* in the different culture media compared to *C. albicans*, in which there was a better growth in medium infusion brain heart + potato dextrose broth (BHI + PDB). In the *ex vivo* test, a maturation of biofilm composed of bacterium and yeast was observed in BHI + PDB medium. **Conclusion.** The biofilm has a growth and maturation at 21 days in incubation with medium flow

Keywords: Biofilm. *E. faecalis*, *C. albicans*

INTRODUCCIÓN

El humano, antes del nacimiento se encuentra estéril es decir libre de microorganismos. Durante el nacimiento se inicia el proceso de infección de microorganismos a través de la entrada y colonización del cuerpo humano. Las fuentes de microorganismos son el tracto genital materno, la cavidad oral y el tracto respiratorio superior, los alimentos y el ambiente (1).

La cavidad bucal es uno de los ambientes más sépticos del organismo, con una compleja microbiota tanto cuantitativa como cualitativamente. Esta complejidad está determinada por la presencia de bacterias responsables de la patología pulpar y periapical (2).

La afección pulpar es una de las patologías más frecuentes dentro de la práctica clínica y puede conducir a la pérdida de vitalidad del órgano dental. A pesar de no existir cifras concretas con respecto a la incidencia de pulpitis, es una de las causas más importantes por las que las personas acuden a la atención dental de urgencia.

Si la pulpitis sigue avanzando, sin intervención, puede resultar en una necrosis pulpar. En estos casos es necesario realizar un tratamiento del sistema de conductos del diente afectado, con el fin de remover todos los restos pulpares y obturar con un material inerte. Durante el tratamiento se intenta erradicar la infección bacteriana del diente, para prevenir la progresión de la enfermedad y la formación de abscesos.

Se han descrito diversas bacterias que participa en el proceso de la caries, pulpitis y necrosis pulpar, dichas patologías cuentan con diferentes microorganismos predominantes en cada una de las etapas del desarrollo de la enfermedad, ocurriendo así un proceso de transición. Por ende es importante conocer los microorganismos ya que muchos de ellos tienen la capacidad de formación de una biopelícula la cual le es útil para su sobrevivencia dentro del sistema de conductos y por ende un desafío para el clínico la eliminación de dicha capa.

El objetivo de este trabajo de tesis fue la estandarización de una biopelícula intraconducto formada por algunos de los principales microorganismos presentes en el sistema de conducto y responsables de las reinfecciones endodónticas, así poder realizar más estudios que nos ayuden a mejorar los tratamientos y tener un pronóstico más predecible.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 PULPA DENTAL

Los dientes tienen su origen en dos de las tres capas blastodérmicas primitivas, el ectodermo y el mesodermo, donde desarrolla un importante papel el ectomesénquima, o mesénquima migrado a la mandíbula o maxilar desde las crestas neurales. En los primeros estadios de la odontogénesis se produce una interacción entre las células epiteliales del ectodermo y las células mesenquimales. La porción ectodérmica dará lugar al esmalte, mientras que las células mesenquimales darán lugar a los tejidos mesodérmicos: dentina, pulpa y cemento. Existen estudios donde se analiza la interacción del tejido ectodérmico y mesodermo para dar origen al órgano dental (3-6).

En el inicio de la odontogénesis aparecen unos brotes de la lámina dental (estadio de brote). Cuando el brote prolifera determina una concavidad que adquiere el aspecto de casquete. Su cavidad central encierra una serie de células ectomesenquimales, la futura papila dentaria, que dará lugar al complejo dentinopulpar. En el estadio de campana, las células de la periferia de la papila dental darán lugar a los odontoblastos y el resto se diferenciarán hacia fibroblastos (4).

La papila dental una vez madura cambia el nombre a pulpa dental, ésta es un tejido conectivo laxo compuesto de células, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental, vasos sanguíneos y nervios, situada dentro de paredes

rígidas de dentina mineralizada. A pesar de que la pulpa dental comparte muchas propiedades con otros tejidos conjuntivos del cuerpo, su localización única le impone varias restricciones especiales respecto a su desarrollo, mantenimiento y respuesta a la agresión (7).

Es obvio que la composición y estructura de la pulpa es muy diferente a las de la dentina. Sin embargo, los dos tejidos existen en una relación íntima tanto embriológica como funcionalmente, por lo que la dentina y la pulpa son comúnmente estudiadas juntas en una unidad funcional inseparable denominado complejo pulpodentinario o dentinopulpar (7).

El complejo dentinopulpar es muy propenso a diferentes tipos de agresiones, físicas químicas y biológicas siendo estas últimas las más frecuentes por agentes microbianos causando una infección en el tejido pulpar.

1.1.1 INFECCIÓN PULPAR

La infección endodóntica se presenta siempre como una patología característica complejas por su organización y su terreno de implicancia. La microbiota predominante es mixta y con asociaciones e interrelaciones, se manifiesta con cuadros dependientes de las propiedades de las especies microbianas, del tiempo de permanencia de las mismas, de las condiciones de los tejidos de la pulpa y de los factores de defensa del hospedero (8).

Aunque agentes físicos y químicos pueden causar inflamación pulpar, en general pueden ser no tan preocupantes porque tales estímulos tampoco son usualmente

persistentes. En realidad, los microorganismos y sus productos representan el principal factor causante de agresiones al tejido pulpar (9, 10).

En una lesión de caries dentinaria, la simple difusión de los productos bacterianos por los túbulos dentinarios es suficiente para desencadenar un proceso de inflamación pulpar, es decir, la pulpa se inflama incluso antes de su exposición. Estos casos se suele diagnosticar como pulpitis reversible, pues una vez removida la caries la pulpa vuelve a la normalidad, de igual forma cuando hay exposición de la pulpa a la cavidad oral (por caries u otros factores) y ésta mantiene vitalidad, consigue defenderse de la invasión bacteriana por la inflamación (11).

La infección se restringe a la superficie expuesta al nivel de la cámara pulpar. Más profundamente, la pulpa de los conducto radiculares y los tejidos perirradiculares no estarán infectados, pero normales o sólo inflamados. Sin embargo, dado que no es posible, el tejido pulpar está protegido en su parte más externa por el esmalte y la dentina a nivel coronal, a nivel radicular por la dentina y cemento, cuando algún agente externo genera una lesión a estos tejidos puede comprometer la integridad de la pulpa y ocasionar cambios inflamatorios o degenerativos a nivel de este tejido que pueden variar en magnitud y severidad. La inflamación y posterior muerte pulpar tiene como etiopatogenia una lesión sobre este tejido; la literatura especializada reconoce como causas agentes bacterianos, químicos o iatrogénicos (12, 13). Ante la ausencia de cualquiera de estos factores, el hallazgo de muerte pulpar y posterior daño a tejidos del periápice cuestiona su origen. Determinar cuáles son los microorganismos que se

encuentran en los órganos dentales puede llegar a establecer su procedencia. Se sabe que son propios de enfermedad pulpar microorganismos como: *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp*, *Treponema spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Eubacterium spp*, *Actinomyces* y *Streptococcus spp* (14).

Nuestra comprensión del microbioma endodóntico está evolucionando y mejorando con el tiempo. La distribución percibida de las bacterias en las infecciones endodónticas se ha desplazado a medida que la ciencia avanza permite que más especies se vuelven cultivables (Camara de anaerobiosis) y detectables (PCR) (15).

Haapasalo y Col. (1989)Haapasalo (16), reportó un informe sobre la microbiología de 62 conductos radiculares humanos infectados, prestando atención a las especies de Bacteroides. Sus resultados confirmaron los hallazgos de las investigaciones anteriores: casi todas las infecciones del conducto radicular son mixtas y los síntomas agudos se relacionan por lo general con la presencia de anaerobios específicos como: *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Prevotella (Bacteroides) buccae* (16).

Las lesiones de la pulpa dental, han sido motivo de investigación por las alto indice de casos que se presentan, estas han sido siempre polémicas y controversiales, ya que estas pueden desencadenar lesiones tisulares en la zona del periápice.

Las infecciones endodónticas se han relacionado con la microbiota oral comensal, que coloniza y prolifera en el sistema del conducto radicular como consecuencia

de la necrosis pulpar. Secundario a caries, traumatismo dental o restauraciones defectuosas o causado por un tratamiento endodóntico fallido (17).

La etiología de la afectación pulpar está marcada por invasión microbiana a través de la caries dental y las periapicales responden principalmente a traumatismos dentarios. Las diferencias morfológicas entre la dentición primaria y permanente hace que los procesos pulpares y periapicales difieran también entre las dos denticiones. Diversos autores han concluido que la pulpa de los dientes primarios responde más rápidamente a la caries dental que la pulpa de dientes permanentes; además muestran que los cambios inflamatorios pueden desarrollarse cuando las bacterias han penetrado tan solo 1.8 mm dentro de la pulpa (18-20).

Aunque existan factores químicos y físicos que puedan inducir inflamación perirradicular, la evidencia indica que los agentes microbiológicos son esenciales en la progresión y perpetuación de patología inflamatoria perirradicular. Miller (1890) realizó un estudio donde analizo la invasión de los túbulos dentinarios, de dentina cariada y no cariada e informó de que la microflora tubular constaba de cocos y bacilos. Pero mas tarde la evidencia experimental estableció el rol de las bacterias en las caries y patologías pulpares y periapicales (14).

Para infectar a un hospedador, un microorganismo tiene que adherirse a los tejidos y multiplicarse en cantidad adecuada, resistiendo los mecanismos de defensa. Para que la colonización ocurra, no solo son importantes las características de la bacteria, sino también como tiene lugar la interacción; es

decir, la puerta de entrada y la dosis de infección. Una vez que una cantidad suficiente de microorganismos ha penetrado por la ruta adecuada en el hospedador, para establecer una colonización debe fijarse a los tejidos o a algún sustrato y proliferar. De este modo se produce una interacción específica entre dos moléculas, una microbiana (adhesiva) y otra del hospedador (receptor). Los microorganismos tienen que ser capaces de utilizar los nutrientes disponibles, competir o cooperar con el resto de las especies presentes y proliferar para producir la infección. Cuando esto ocurre, los microorganismos han colonizado al hospedador.

Los conductos radiculares infectados son la principal causa de irritación persistente a los tejidos perirradiculares. lo que muestran los estudios científicos que los microorganismos intrarradicales y extrarradicales son los principales responsables del mayor porcentaje de fracasos en los tratamientos endodónticos y normalmente es el resultado de la compleja eliminación de los microorganismos en la zona apical del sistema de conductos (21, 22), ya que se alojan en zonas estratégicas y ausencia del sistema inmunitario como en conductos con tejido necrótico. ya que, se encuentran exentos de la acción de las células de defensa del hospedador (fagocitos) y moléculas (anticuerpos, complemento). Por otro lado, la microbiota localizada en la zona apical del sistema de conductos se encuentra normalmente delimitada por los tejidos perirradiculares inflamados compuestos por una acumulación densa de polimorfonucleares en o cerca del foramen apical (23).

En ocasiones, algunas especies bacterianas pueden llegar y establecerse en los tejidos perirradiculares. Así, aunque la infección no es eliminada por los mecanismos de respuesta inmunológica, esta forma una respuesta adyacente al foramen apical, impidiendo la propagación de la infección. normalmente se obtiene un equilibrio entre la agresión y la defensa, desarrollando una enfermedad crónica en los tejidos circundantes generando un tracto de salida llamado estoma o fístula (24).

Si la infección endodóntica es eliminada con el tratamiento de conductos, el hospedador se verá favorecido y se producirá la reparación tisular. El fracaso del tratamiento de endodoncia, que es atribuible a los microorganismos remanentes, solo se producirá si estos microorganismos poseen suficiente patogenicidad, se encuentran en número suficiente y llegan a los tejido perirradiculares.

La invasión bacteriana de los túbulos dentinarios se produce por un mecanismo similar a lo señalado. La matriz intertubular contiene grandes cantidades de fibras de colágeno tipo I no mineralizado. Los *estreptococos* orales poseen antígenos polipeptídicos I y II en superficie, que reconocen el colágeno que les sirve como substrato de adhesión y se absorben en la superficie de hidroxiapatita. Esta capacidad de los estreptococos de unirse al colágeno facilita la adhesión bacteriana a la dentina o al cemento, regula la producción de antígenos polipéptidos I y II e induce la proliferación bacteriana que se manifiesta como largas cadenas de estreptococos, facilitando así la invasión tubular.

La invasión tubular puede ser clasificada en 3 categorías según el momento en que los microorganismos ingresaron al sistema de conductos radiculares: infecciones primarias, secundarias y persistentes. Los microorganismos que inicialmente invaden y colonizan la pulpa necrótica causan una infección endodóntica primaria, mientras que en las infecciones secundarias los microorganismos ingresan al sistema del conducto radicular después de la intervención profesional y por último infecciones persistentes son aquellas que la lesión no responde al tratamiento de conductos (5, 6). Las infecciones endodónticas primarias se han caracterizado como estructuras polimicrobianas que están dominadas por bacterias anaerobias (6). Las infecciones endodónticas persistentes son causadas por microorganismos que una vez fueron miembros de infecciones primarias o secundarias, pero ganaron resistencia a los procedimientos antimicrobianos durante el tratamiento del conducto radicular y soportaron duras condiciones ambientales (25).

Usualmente, no es clínicamente posible distinguir entre infecciones endodónticas secundarias y persistentes. Cultivo con técnicas de anaerobiosis y estudios moleculares como reacción en cadena a la polimeraza (PCR) han encontrado relación entre infecciones endodónticas secundarias / persistentes con una microbiota menos diversa comparada con la gran variedad de microorganismos en infecciones primarias. Sin embargo, los análisis actuales de la microbiota endodóntica utilizando técnicas de alto rendimiento y cobertura profunda (p. Ej., Pirosecuenciación) han revelado que las infecciones endodónticas secundarias /

persistentes albergan microbiotas tan diversas como las encontradas en las infecciones primarias (25).

Una comprensión profunda de la etiología microbiana y las características de las infecciones endodónticas es un paso necesario para desarrollar protocolos de desinfección intraconducto. Sin embargo, el descubrimiento de microorganismos en conductos sigue siendo desafiante para el clínico con la mayoría de las bacterias aún desconocidas o sin cultivar

1.1.2 BACTERIAS EN EL CONDUCTO RADICULAR

Gracias a los avances de la microbiología en estudios moleculares y bioquímicos se han aislado más 500 especies bacterianas a partir de infecciones endodónticas. El cultivo microbiano es el único método de diagnóstico comúnmente disponible para los profesionales, aunque la sensibilidad de la detección basada en cultivos es significativamente menor que la de los métodos moleculares (17).

Por otro lado, los diagnósticos basados en cultivos pueden proporcionar resultados clínicamente más relevantes ya que, a diferencia de los métodos moleculares, el método solo detecta bacterias viables con el potencial de causar infecciones persistentes. Sin embargo, existen desafíos en el uso de diagnósticos basados en cultivos en infecciones anaeróbicas. La mayoría de los anaerobios requieren medios de transporte específicos para mantener su viabilidad, y los retrasos en el transporte de muestras tienen un impacto significativo en su supervivencia.

La capacidad de un microorganismo de causar enfermedad se denomina patogenicidad. La virulencia indica el grado de patogenicidad de un microorganismo y los factores de virulencia son los productos microbianos, los componentes estructurales o las estrategias que contribuyen a la patogenicidad. Los factores de virulencia de las bacterias consisten en componentes estructurales celulares y sus productos liberados. Los métodos que utilizan las bacterias que contribuyen a la patogenicidad son la capacidad de formar agregados y crear biopelículas, que les confiere protección frente a las defensas del huésped y los agentes antimicrobianos (26).

Algunos microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares tienen la capacidad de formar biopelículas como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* enlistados como principales agentes etiológicos responsables del desarrollo de pulpa necrótica, patología periapical y enfermedad persistente después del tratamiento de conductos. Comúnmente, producen una matriz exopolimérica que se adhiere a la superficie de la dentina a la cual se le conoce como biopelícula sésil. El aumento de la resistencia de las bacterias formadoras de biopelículas contra diferentes compuestos antimicrobianos es un motivo de preocupación. Dado que estos microorganismos responsables de la infección periapical asociada con biopelículas no pueden ser eliminados por el mecanismo de defensa del huésped, es necesario tratarlos por medios químicos y mecánicos (27).

1.2 BIOPELÍCULA MICROBIANA

Desde los años 70, sin comprender completamente su estructura o metabolismo, se relacionaron este tipo de comunidades a los efectos que mostraron sobre los ambientes que habitaban. Es así como la teoría sobre biopelículas fue descrita en 1978, ésta presentó una hipótesis que indica de que la mayoría de las bacterias crecen en una matriz adherida a la superficie de los ecosistemas, presentado una gran diferencia con sus homólogas que subsisten en forma de planctónica. Hoy en día gracias a los métodos actuales, se ha logrado comprender la ultraestructura, las relaciones metabólicas, la dinámica y los efectos patógenos que provocan (28).

El término biopelícula se define como el sistema más común de organización microbiana. Está formado por uno o varios microorganismos unidos a una superficie viva o inerte es decir orgánico o inorgánico. Las biopelículas poseen características funcionales y estructuras complejas. En una biopelícula, los microorganismos se envuelven en una matriz extracelular hecha de polisacáridos que muestran una forma de tulipán o seta con la presencia de canales de agua internos. Las bacterias que flotan libremente en un ambiente acuoso, los microorganismos planctónicos prevalecen en una solución a base de agua, estos son requisito previo para la formación de la biopelícula. En contextos dentales, se establece una estructura biofilmática bien conocida y ampliamente estudiada durante la unión de las bacterias a los dientes para formar la placa dental. Aquí,

las bacterias libres en la saliva (organismos planctónicos) sirven como los primeros colonizadores. Además, las biopelículas forman etapas de interacción entre los microorganismos y las células hospedadoras creando una comunidad metabólica que contribuye de manera compleja a la supervivencia del microorganismo (29, 30).

Gran cantidad de enfermedades del ser humano se encuentran relacionadas a este tipo de organización infecciosa, las otitis, ciertas lesiones músculo esquelético, la endocarditis bacteriana, algunas neumonías y estrictamente relacionadas a la odontología la periodontitis, caries y la enfermedad pulpar.

El estudio de las biopelículas microbianas asume una gran importancia en diferentes sectores de la microbiología industrial, ambiental y médica. En microbiología médica, las biopelículas se han estudiado cada vez más y las estimaciones indican que las infecciones por biopelícula comprenden entre el 65% y el 80% de las infecciones humanas en el mundo desarrollado. En cuanto a la cavidad oral, la caries, la gingivitis y la periodontitis marginal son ejemplos de enfermedades causadas por biopelículas bacterianas en forma de placa dental supragingival o subgingival (31).

El sistema de conductos es un área ideal para que los microorganismos puedan crecer y desarrollar una biopelícula. Los nuevos conceptos de resistencia bacteriana en endodoncia están mostrando el importante papel del *Enterococcus faecalis*, la cual fue encontrada con mayor frecuencia al hacer el análisis de la

microbiota de los conductos radiculares que presentaron infecciones persistentes, lo cual se asume a su capacidad de formación de biopelícula (32, 33).

Tronstad y col. (1990) demostraron la presencia de estas biopelículas en lesiones perirradiculares adyacentes al foramen apical y en colonias bacterianas dentro de granulomas periapicales (34).

En la endodoncia el término biopelícula ha sido relacionado con infecciones en dientes no vitales. Se ha discutido principalmente en el marco de las apariencias bacterianas en las puntas de las raíces de los dientes con pulpas no vitales. Se ha relacionado que tales agregaciones bacterianas son la causa de la periodontitis apical resistente a la terapia de conductos. Aunque no se describe con gran detalle, se han observado condensaciones bacterianas en las paredes de los conductos radiculares infectados, lo que sugiere que también pueden existir mecanismos para la formación de una biopelícula dentro del espacio del sistema de conductos. De hecho, la formación de una biopelícula endodóntica se han conseguido hacer y estudiar de manera *in vitro* y *ex vivo* e dientes extraídos con cultivos mixtos de bacterias anaeróbicas o cultivos puros de *E. faecalis*.

1.2.1 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

El proceso de formación de la biopelícula en el conducto radicular no es aún muy conocido. La teoría más aceptada consta de cuatro fases y fue descrita por Svensater y Bergenholtz (**Figura 1**). En la primera fase se forma una película adhesiva sobre la dentina, promovida por el depósito de proteínas y otros

compuestos derivados de las bacterias en suspensión del proceso de necrosis y/o inflamación, etc. En la segunda fase, sobre esa película pegajosa, se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión, de todas las que están en suspensión. En la tercera fase, la primera capa de bacterias ya adherida segrega mediadores que, por un lado, van fijando más y más bacterias, de esa estirpe o de otras, y por otro, va formando la matriz extracelular de polisacárido, primera barrera defensiva característica de la biopelícula. En la cuarta, la biopelícula va madurando y creando sistemas de defensa contra antibióticos e irrigantes endodónticos. En la quinta y última, arroja bacterias al exterior que vuelve crónica la respuesta inflamatoria del hospedador. Siqueira y Rocas exponen que en esta etapa la biopelícula se puede constituir de 15% de bacterias y 85% de matriz de polisacáridos, además de contar con más de 300 capas de bacterias superpuestas (11).

En cualquier entorno natural, las macromoléculas y los microorganismos rara vez flotan libremente, pero tienen una fuerte tendencia a asociarse con las superficies y formar comunidades microbianas adherentes. Por tal motivo la formación de biopelículas se producirá en las superficies de cualquier sistema que entre en contacto con un líquido natural. Si bien la organización estructural de las biopelículas, la composición y las actividades de los microorganismos colonizadores en diversos entornos pueden ser diferentes, el establecimiento de una micro-comunidad en una superficie parece seguir esencialmente la misma serie de etapas de desarrollo, incluida la deposición de una película

acondicionadora, adherencia y colonización de microorganismos planctónicos en una matriz polimérica, cohesión de otros organismos y propagación de microorganismos residentes de la biopelícula para ir a colonizar otras áreas.

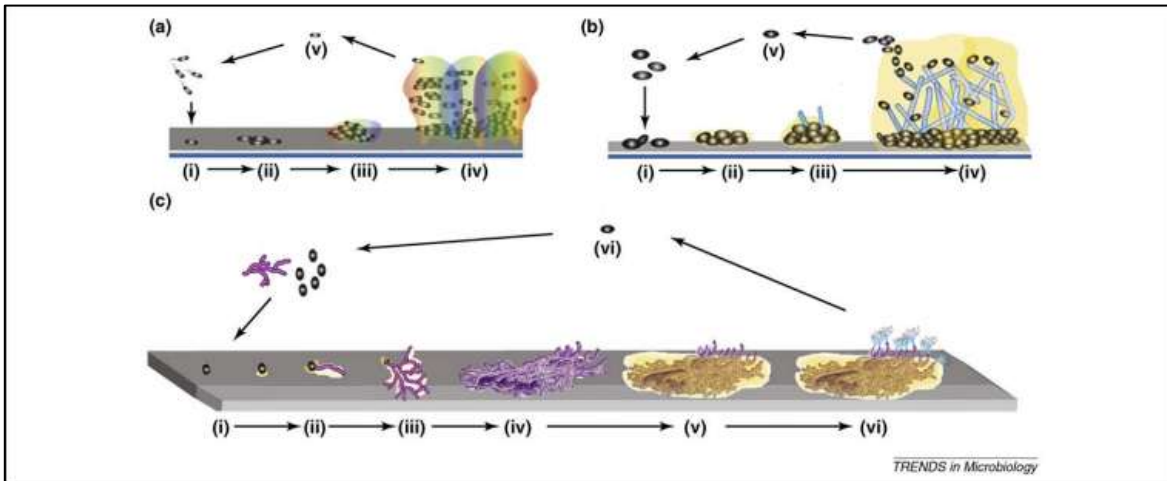


Figura 1. Modelos de desarrollo de biopelículas en bacterias, levaduras y hongos filamentosos. En las bacterias (a) y *Candida albicans* (b), generalmente se definen cinco etapas: (i) adsorción, (ii) adhesión, (iii) formación de microcolonia, (iv) biopelícula madura y (v) dispersión. Nuestro modelo para el desarrollo de biopelículas en hongos filamentosos (c) incluye las siguientes etapas: (i) adsorción, (ii) fijación activa, (iii) microcolonia I (germinación y / o monocapa), (iv) microcolonia II (desarrollo micelial, capas de hifas, agrupación de hifas), (v) desarrollo de la biopelícula madura, y (vi) dispersión o fase planctónica.

1.2.2 BIOPELÍCULAS EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS

La cavidad oral es la fuente común de microorganismos que pueden colonizar los conductos radiculares después de la pérdida de la vitalidad pulpar, existe un conocimiento bastante escaso sobre la formación de una biopelícula en las

infecciones endodónticas. Posiblemente Nair fue la primera persona en identificar las estructuras de las biopelículas en las raíces infectadas. Sobre la base de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), examinó el contenido del canal radicular de 31 dientes, que presentaba una caries en la corona dental y que el proceso de inflamación periapical estaba relacionado con la extracción. Además de sus observaciones de la microestructura del tejido inflamatorio, que el bulbo principal del organismo existía "recolecciones" de cocos, bacilos, filamentos y espiroquetas. Mientras que la mayoría de estos organismos aparecían suspendidos, en el sentido de que se sentía un espacio en el espacio, los agregados densos se observaban adheridos a las paredes del canal y formaban capas delgadas a gruesas de condensaciones bacterianas. El material amorfo llenó los espacios inter-bacterianos y fue interpretado como una matriz extracelular de origen bacteriano. Cuando se produjeron, las condensaciones bacterianas mostraron una estructura empedrada similar a la de las superficies dentales internas superficiales, lo que sugiere mecanismos similares para la unión bacteriana que los de la placa dental. Empleando un conjunto similar de dientes extraídos como Nair, Sjögren (28), observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) 2 mm de los canales radiculares infectados donde los cocos, las varillas y / o los filamentos formaban a menudo micro colonias en esta área en la que se intercalaron las espiroquetas. Sin embargo, raramente las espiroquetas se reunían en grupos. Los cocos también se vieron adheridos a los filamentos ensamblados en las estructuras denominadas "mazorca de maíz", que también se describen para la placa dental (28).

1.3 ENTEROCOCCUS FAECALIS

Enterococcus faecalis, es una especie enterobacteriana Gram-positiva, presente en el cuerpo humano. generalmente se considera un comensal del tracto gastrointestinal y cavidad oral normal de los mamíferos, gracias a su capacidad para soportar una variedad de condiciones adversas le da la oportunidad de sobrevivir en otros entornos. También es considerado un patógeno oportunista que puede causar infecciones nosocomiales, incluida bacteriemia y patogénesis basada en biopelículas, como endocarditis e infecciones del tracto urinario y patologías endodónticas.

Dentro de las numerosas especies bacterianas existentes, una de las más frecuentemente encontradas en dientes con necrosis pulpar (sin historia previa de endodoncia) y la más aislada en aquellos con recidiva de infección (dientes con indicación de retratamiento) es *E. faecalis* (35).

E. faecalis es responsable de 80 a 90% de las infecciones microbianas. Esta bacteria es la especie *Enterococcus* más detectada en afecciones endodónticas.

Sin embargo, los datos sobre la prevalencia oral de *E. faecalis* y sus factores de virulencia varían entre los estudios. Esta variación podría deberse a las diferentes condiciones de la pulpa dental o a las diferentes ubicaciones geográficas de los individuos incluidos, las áreas en el canal que son inaccesibles para los

instrumentos y los irrigantes pueden permanecer contaminadas después de la preparación biomecánica y ser responsables de una infección persistente (36-38).

E. faecalis es un agente importante para la causa de los fracasos en los tratamientos endodónticos. Sin embargo, los enterococos no son favorecidos por las condiciones del conducto radicular no tratado, siendo así solo un poco porcentaje de la flora endodóntica inicial. Sin embargo, una vez que entran al sistema de conductos y se establecen, pueden resistir el tratamiento antimicrobiano, incluidos los medicamentos provisionales, y persistirán después de la obturación. Byström y Sundqvist en 1981 encontraron que *E. faecalis* es altamente resistente a los medicamentos antimicrobianos, como el hidróxido de calcio (39). Por lo tanto, la presencia de *E. faecalis* en el momento de la obturación puede reducir significativamente la tasa de éxito del tratamiento del conducto radicular (1, 40, 41).

Chong y Col. (2017) informan una nueva forma de metabolismo dependiente de hierro para *E. faecalis* donde, en ausencia de hierro, los componentes de la respiración se pueden utilizar para la transferencia de electrones extracelular (EET). El hierro aumenta el crecimiento de la biopelícula de *E. faecalis* y genera alteraciones en la matriz de la biopelícula, la distribución espacial de las células y las propiedades de la matriz de la biopelícula (42-46).

1.4 FORMACIÓN DE BIOPELICULA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

La adherencia sobre un sustrato es la etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula. se ha observado en bacterias Gram negativas que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli toman un importante papel en la adherencia primaria. Pero también las células bacteriana gran positivas como *E. faecalis* que sin importar la actividad motora estas tienen la capacidad de formar una biopelícula (47, 48)

En bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp). cuando la bacteria termina adhiriéndose a una superficie comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia en forma de torre o de hongo con canales intercalados que están separados del entorno externo y a través de los cuales los fluidos se mueven por convección (47).

En una segunda etapa para la formación de biopelículas que contribuye a la virulencia hidrolizando sustratos del hospedador, como colágeno, fibrinógeno, fibrina, endotelina-1, bradiquinina, LL-37 y componentes del complemento C3 y C3a. Los genes que codifican la gelatinasa (gelE) y la serina proteasa (sprE) crean un operón controlado por el sistema de detección de quórum sensing, ubicado en agua formando gelatinasa (48, 49).

En esta etapa la bacteria comienza a secretar matriz de sustancias poliméricas que constituye la parte primordial de la biopelícula y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) en la cual se observan la presencia de canales de agua. Las células dentro de las biopelículas que se encuentran más profundas se exponen a condiciones ambientales diferentes a las que se localizan en la parte superficial, ejemplo la disminución de oxígeno (47, 49).

La capacidad de *E. faecalis* para formar biopelículas puede conferir una ventaja ecológica en determinadas situaciones. Por ejemplo, cepas clínicas de *E. faecalis* aisladas de conductos radiculares con infecciones recurrentes o secundarias. Esto puede atribuirse en parte a rasgos específicos de virulencia, como la producción de gelatinasa y la presencia del determinante de adherencia. Las condiciones bajo las cuales pueden ocurrir biopelículas en los conductos radiculares infectados in vivo no son bien entendidas.

1.5 CANDIDA ALBICANS

Candida albicans es un hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 μm) e hifas puede ser patógeno comensal u oportunista posee capacidad de causar una variedad de infecciones a los seres vivos, desde afecciones superficiales hasta aquellas que comprometen la vida. Algunos factores predisponentes para las infecciones por *C. albicans* incluyen terapia inmunosupresora, terapia con antibióticos, uso de

dispositivos permanentes y catéteres intravenosos, infección por VIH, diabetes y vejez (50).

La *C. albicans* es el principal hongo presente en dispositivos médicos y causa frecuente de infecciones nosocomiales. Varias especies de *cándida*, incluyendo *C. albicans*, son parte de la microbiota en las mucosas de la mayoría de los individuos sanos y residen en el tracto gastrointestinal y genitourinario. Estos microorganismos están preparados para causar alguna infección cuando un nicho adecuado esté disponible (51).

El papel de una biopelícula bacteriana, incluidos los hongos como *C. albicans*, en la participación de la periodontitis apical causada por infecciones endodónticas ha quedado bien establecido. La especie *C. albicans* se considera más patógeno que otras especies de *Candidas* debido a la propensión a formar biopelícula en varias superficies del sustrato, que son altamente adherentes y proporcionan un nicho de protección para sus células.

Los factores de virulencia adicionales incluyen la transición morfológica de las hifas, la adhesión a una variedad de superficies, la evasión e inmunomodulación de la defensa del hospedero, el tigmotropismo y la secreción de enzimas hidrolíticas; estas propiedades pueden desempeñar un papel importante en el establecimiento de la periodontitis apical persistente después del tratamiento convencional del conducto radicular.

El inicio y la persistencia de las infecciones en conductos radiculares causadas por *Candida* dependen de su colonización y penetración dentinaria. Ya que *C. albicans* tiene una afinidad específica de adhesión por el colágeno tipo I.

El colágeno y las proteínas de la matriz extracelular en la dentina promueven la adhesión celular y la colonización y los iones Ca^{2+} facilitan su morfogénesis a estado hifa. Además, la capacidad de *C. albicans* para detectar el contacto con la dentina (tigmotropismo) y su dimensión microscópica (levaduras de 1-6 μm e hifas de 1.9-2.6 μm de diámetros) les permite invadir y penetrar los túbulos dentinarios.

C. albicans puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. Durante el embarazo, la vejez o la infancia son frecuentes las candidiasis superficiales y lo mismo sucede en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos. En personas con inmunodeficiencias celulares, como los individuos infectados con VIH, es frecuente observar un incremento de las candidiasis mucocutáneas por *Cándida* cuando disminuye el número de linfocitos T cooperadores (CD4^+). Relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto para determinan el

fenotipo y virulencia de cada aislamiento clínico. Entre los genes conocidos asociados a la virulencia de *C. albicans* están el gen de la hexosaminidasa (HEX1), varios genes de proteinasas aspárticas (SAP1, SAP2, SAP3 y SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (α INT1).

En las últimas décadas, las infecciones producidas por hongos están siendo cada vez más reconocidas como una importante amenaza para la salud de la población, principalmente de pacientes comprometidos inmunológicamente.

C. albicans es un importante patógeno fúngico en los humanos, tanto en términos de su importancia clínica como de su uso como un modelo experimental para la investigación científica. La comprensión de la biología de este patógeno es un requisito importante para la identificación de nuevas dianas de medicamentos para la terapia antifúngica.

C. albicans es el hongo patógeno humano más estudiado y también sirve como un organismo modelo para el estudio de otros patógenos fúngicos más desafiantes experimentalmente. Es conocida por ser un hongo oportunista en el entorno de cualquier tipo de organismo vivo, es un modulador de pH en la biopelícula y no se considera como un cariogénico, pero uno de sus hábitats es la cavidad oral de los seres humanos. *Cándida albicans* coloniza de manera asintomática diversas partes del cuerpo específicamente los tractos gastrointestinal y genitourinario de personas sanas (52).

Es un hongo comensal, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos es un posible patógeno oportunista que es capaz de causar infecciones de las mucosas y sistémicas. La transición entre la forma de crecimiento de levadura a hifa es importante para desarrollar su patogenicidad, las hifas tan solo se reproducen en el momento de la invasión a los tejidos, existiendo numerosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean su conversión; por ejemplo, a un pH bajo inferior a 6. este microorganismo crece en la forma de levadura mientras que en un pH alto superior a 7 crece en forma de hifa por tal motivo *C. albicans* puede infectar fácilmente la dentina de los órganos dentales y causar enfermedades intraconducto y estas desencadenar infecciones o lesiones en los tejidos periapicales (51, 53-55)

C. albicans es un microorganismos presente en las infecciones endodónticas y éste al tener la capacidad de formación de biopelícula puede incrementar el reto para el endodoncista, por ellos se implementan las técnicas de desinfección con diferentes irrigantes y acompañada de medicaciones intraconducto para reducir sustancialmente o erradicar *C. albicans* de los conductos radiculares, los fármacos intraconducto deben ser capaces de desinfectar la dentina infectada (56).

1.6 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE CANDIDA ALBICANS

La formación de biopelículas de *C. albicans* se inicia cuando las levaduras se adhieren a la superficie tisular y las biopelículas se forman como etapa temprana (8-11 horas), intermedia (12-30 horas) y madura (38-72 horas)(**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La biopelícula madura consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, recubiertas por una matriz extracelular y frecuentemente asociada con bacterias.

En el caso de los hongos filamentosos, la secreción de hidrofobinas participa en la formación de estructuras aéreas, en la unión de la hifa a superficies hidrofóbicas y en la formación de estructuras más complejas (50, 53, 57).

De igual forma existen señales como moléculas quorum sensing, sintetizadas por las células que forman la biopelícula y que se distribuyen de unas a otras como señales de comunicación. La síntesis de dichas moléculas incrementan directamente proporcional con el aumento de densidad celular y a un determinado umbral, interaccionan con sus receptores provocando la expresión de genes específicos. El circuito quorum sensing coordina una gran variedad de funciones fisiológicas, interviniendo en la inducción y formación de biopelículas maduras. El tirosol y el farnesol, moléculas quorum sensing, actúan de diferente forma; el tirosol favorece la formación de la biopelícula en las etapas iniciales e intermedias del desarrollo, mientras que el farnesol evita el desarrollo excesivo de la misma.

Harding y Col (2009) describe las etapas de formación de biopelícula en hongos filamentosos, como a continuación se menciona: a) adsorción de propágulos, b) unión activa a superficies, c) formación de colonias I, donde hay crecimiento y colonización de hongos y ramificación de hifas a través de la superficie como monocapa y producción de matriz extracelular que se adhiere al sustrato, d) formación de colonias II, que involucra la formación de redes de hifas compactadas de micelo y adhesión hifa-hifa y formación de canales de agua, e) maduración y desarrollo reproductivo, donde se forman cuerpos fructíferos, células esporógenas, esclerotia y otras estructuras de supervivencia, y f) dispersión de esporas o liberación de fragmentos de biopelícula para reiniciar el ciclo (52, 55, 58, 59)

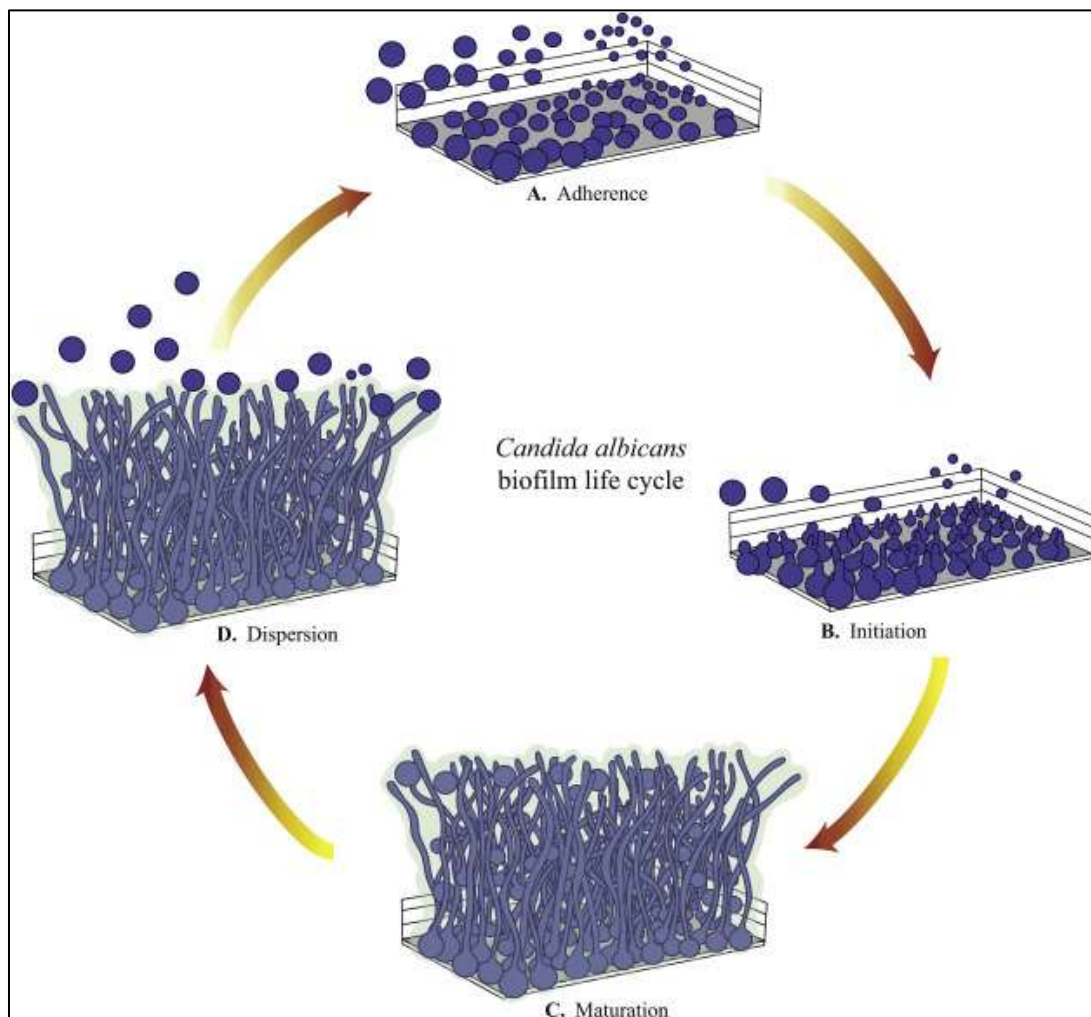


Figura 2. Ciclo de vida de una biopelícula de *C. albicans*. A. Adherencia de células de levadura redondas a una superficie. B. Iniciación de la formación de biopelículas, donde las células proliferan para formar una capa basal de células adheridas. C. Maduración de la biopelícula, donde se desarrollan capas complejas de células polimórficas y quedan encerradas en una matriz extracelular. D. Dispersión, donde las células de levadura redondas dejan la biopelícula madura para sembrar nuevos sitios.

1.7 ANTECEDENTES

Arias y Ferrer (2012), realizaron una biopelícula de *Enterococcus faecalis* aislado de conductos radiculares que fueron cultivarlos en microplacas y usar método de cristal violeta, elución con alcohol y tres procedimientos: sin fijación, fijación térmica y 10% de formaldehído. La biopelícula se evaluó utilizando un lector de microplacas Versamax. Se incubaron veinte porciones de raíces estériles en caldo TS con *E. faecalis* durante 2, 4, 7, 14 y 30 días, después de los cuales fueron procesados y observados en el microscopio electrónico de barrido (MEB), concluyó que se requieren 30 días para la formación de una biopelícula madura (41).

Bulacio y Col. (2015), formó una biopelícula en dientes sumergidos de un aislado clínico de *E. faecalis* incubado en infusión cerebro y corazón (BH) ajustado a MacFarland No. 1 estándar; Todos los dientes se incubaron a 37 °C en viales sellados. Este procedimiento se repitió cada 72 por 30 días. Comprobado pro MEB la formación de biopelícula. El cual mostró el crecimiento de *E. faecalis* en todo momento y el desarrollo de biopelículas a partir de la incubación de 14 días(37).

En un estudio Febres y Col. (2018) evaluaron la capacidad de formación de biopelículas en especies del género ***Candida*** provenientes de muestras clínicas con procesos infecciosos. La cuantificación de la capacidad de formación de biopelículas se realizó por la técnica de microplaca de poliestireno. Entre los

resultados obtenidos en la investigación las especies aisladas fueron: *C. glabrata* (34%), Complejo *C. albicans* (30%), Complejo *C. parapsilosis* (27%) y *C. tropicalis* (9%), de las cuales 41 aislados (59%) formaron biopelículas, resultando el Complejo *C. albicans* y *C. glabrata*, las especies con mayor grado de formación de biopelículas con 29% cada una, seguida de Complejo *C. parapsilosis* con 27% y *C. tropicalis* con 15% (53).

Graham y Col. (2017), realizó modelo *in vitro* de biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans* en medio infusión cerebro corazón en la cual buscaba analizar la bacteriocina de *E. faecalis*, como necesaria y suficiente para la reducción de la virulencia y la formación de biopelículas de *C. albicans*(60).

2 JUSTIFICACIÓN

Las estrategias de defensas de los microorganismos, como la capacidad de formar una biopelícula que dificulta su remoción han llevado a la ciencia a buscar nuevas alternativas o modificación de las ya existentes para poder combatir a los diferentes hongos, bacterias y virus. La Endodoncia como rama de la Odontología está comprometida a buscar nuevas soluciones para las variaciones de las especie microscópicas presentes en el sistema de conductos de los órganos dentales, esto ha llevado a estudiar las diferentes alternativas en los tratamientos endodónticos para realizar las mejores técnicas. Para poder analizar las técnicas actuales, se requiere primero el establecimiento de un modelo de biopelículas intraconducto de las principales especies responsables del fracaso de los tratamientos realizados, una vez establecido un protocolo de elaboración de biopelícula el siguiente paso es analizar los diferentes irrigantes y técnicas de instrumentación, así productos presentes en el mercado para conocer aquellos que permitan la obtención del éxito clínico y biológico.

En el presente estudio se pretende establecer un modelo de biopelícula intraconducto para poder ser utilizada en futuras investigaciones.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un modelo de biopelícula intraconducto de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración y medio de cultivo óptimo para la formación de biopelícula *in vitro* de *E. faecalis*,
2. Determinar la concentración y medio de cultivo óptimo para la formación de biopelícula *in vitro* de *C. albicans*
3. Determinar la concentración y medio de cultivo óptimo para la formación de biopelícula *in vitro* de la combinación *E. faecalis*, *C. albicans*.
4. Evaluar la formación de biopelícula intraconducto de *E. faecalis ex vivo*.
5. Evaluar la formación de biopelícula intraconducto de *C. albicans ex vivo*.
6. Evaluar la formación de biopelícula intraconducto combinando *E. faecalis* y *C. albicans ex vivo*.

4 METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un tipo de estudio experimental *in vitro* y *ex vivo* transversal y comparativo.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA BIOPELICULA *IN VITRO*

4.2.1 CEPAS DE ESTUDIO

Se empleó cepas de *E. faecalis* y *C. albicans* ambas de aislado clínico obtenidas del Laboratorio de Microbiología, que se encuentra en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

4.2.2 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO

Se realizó una inoculación en placas de agar sangre CDC (BD-BBL) y dextrosa papa paraca de cada uno de los tubos que presentaron desarrollo y se incubaron durante 48-72 horas. Después de este tiempo, se observó morfología macroscópica y microscópica de los cultivos con el fin de obtener cultivo puro para su identificación por medio de características de tinción, presencia de esporas y, finalmente, el perfil bioquímico, a través de las pruebas de identificación API 20 Strep y API 20A (Biomeriéux®, Francia).

4.2.3 ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Se utilizó en placas de 96 pocillos se preparó una suspensión bacteriana en caldo de soya tripticaseína (TSB), Luria Bertani (LB), caldo de soya tripticaseína más 5% de extracto de levadura (TSB +EL), caldo Sabouraud dextrosa (SDB), Infusión cerebro corazón (BHI), caldo dextrosa papa (PDB) y Infusión cerebro corazón mas de caldo dextrosa papa (BHI+PDB) (**Figura 4** y **Figura 4**) , de este cultivo se tomó una alícuota ajustada a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL en la escala de 0.5 de McFarland. Para la inducción de formación de la biopelícula se utilizaron microplacas de 96 pocillos; a cada pocillo se añadieron 225 μ L de un tipo de medio TSB, LB, TSB +EL, PDA, BHI, PDB y BHI+PDB. Posteriormente, se inocularon 25 μ L de la suspensión bacteriana previamente preparada en cada uno de los pocillos de la microplaca, quedando una dilución en una relación de 1:10 se realizaron por triplicado cada una de las diluciones. Posteriormente se incubó por 24-48 horas a 37° C.

4.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Pasado el tiempo de incubación, Se utilizó el método de Cristal Violeta en microplacas para la formación y cuantificación de biopelículas (Stepanović, Čirković (61), Coenye, Peeters (62)). se retira el líquido de los pocillos con cuidado

y se realizaron de 2 lavados con buffer de fosfatos estéril (PBS). La fijación de los biopelículas se realizaron con 100 μ L de metanol al 99% por 15 minutos (**Figura 6**), posterior se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Para la tinción de la biopelícula se agregaron 100 μ L de Cristal Violeta (**Figura 7**) y se dejó teñir durante 5 minutos, después se realizaron 3 lavados con PBS estéril. Finalmente, se añadieron 250 μ L de ácido acético al 33% (**Figura 8**) para proceder a su cuantificación; se midió la absorbancia de los pocillos a una Densidad Óptica de 595 nm (DO595). El promedio de DO de los controles negativos, se restó de los valores de DO595 de los pocillos de prueba dando lugar al valor DOc. La interpretación de datos se clasificó siguiendo la escala **Tabla 1** publicada por Stepanović, Ćirković (61)

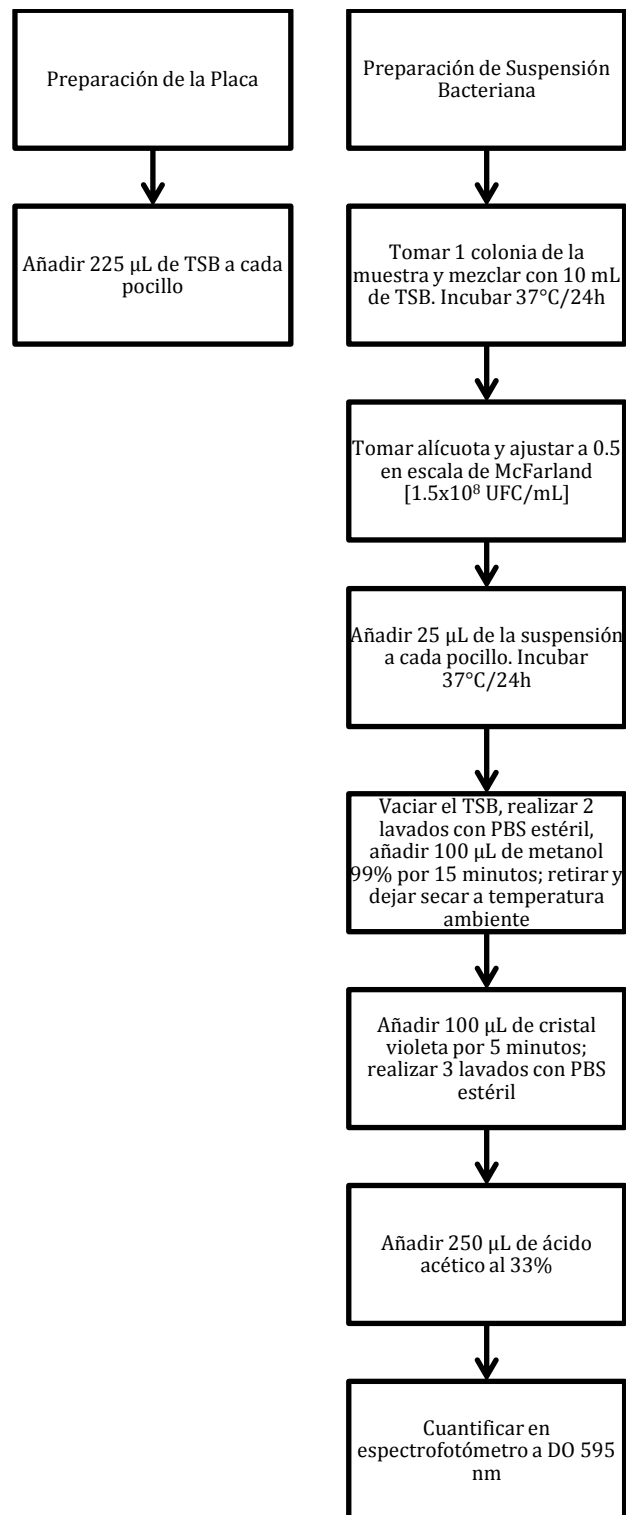


Figura 3. Metodología para la formación y cuantificación de biopelículas.

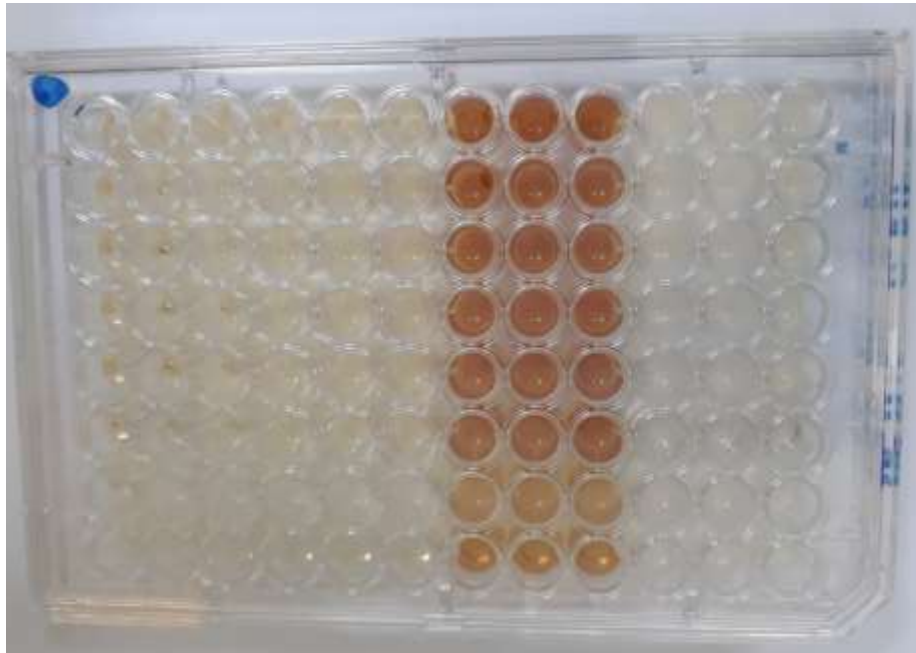


Figura 4. Microplaca de 96 pocillos con inoculación de *E. faecalis* y *C. albicans* en medio TSB, LB, TSB+EL y PDA.



Figura 5. Microplaca de 96 pocillos con inoculación de *E. faecalis* y *C. albicans* en medio BHI, PDB Y BHI+PDB.



Figura 6. Fijación de la biopelícula con metanol al 99.98%.

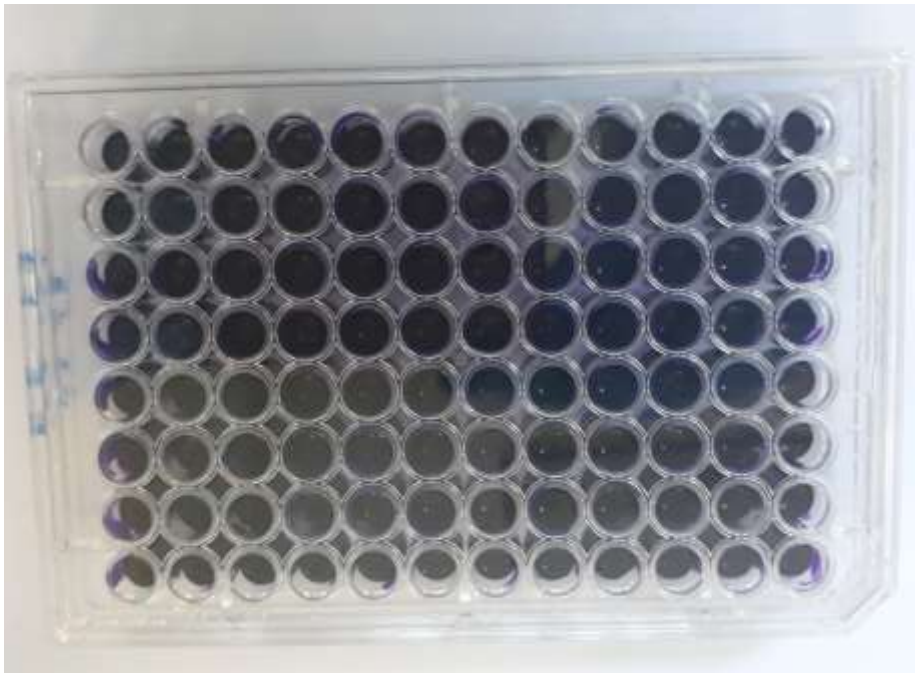


Figura 7. Microplaca de 96 pocillos teñida con cristal violeta



Figura 8. Microplaca de 96 pocillos con ácido acético al 33%.

Tipo de Biopelícula	DO
Negativo	$DO \leq DO_{595}$
Débil	$DO \leq DO_{595} \leq (2 \times DO_c)$
Moderada	$(2 \times DO_c) < DO_{595} \leq (4 \times DO_c)$
Fuerte	$(4 \times DO_c) < DO_{595}$

Tabla 1. Escala de interpretación de la formación de biopelículas

4.3 FORMACIÓN DE BIOPELICULA *EX VIVO*

Se utilizaron 20 premolares, extraídos por indicación ortodóntica a pacientes mayores de 15 años. Los cuales se almacenados en hipoclorito de sodio al 0.01% a 4°C, después de la limpieza de la superficie radicular con curetas periodontales.

Los dientes fueron decoronados en la unión cemento esmalte con un disco de diamante a baja velocidad con irrigación de suero fisiológico. Los segmentos radiculares se prepararon a una longitud de 12 mm.

Los conductos radiculares fueron preparados con la técnica de Hapasalo iniciando un acceso radicular con fresas Gates Gliden no.3 y 2 seguido de la toma de longitud de trabajo con limas tipo k de ISO 10,15 y 20 en orden creciente irrigando con hipoclorito de sodio al 5.25% entre cada lima.

Para la remoción de debri orgánico e inorgánico, incluyendo el smear layer, se utilizó un baño ultrasónico en EDTA al 17%, seguido por hipoclorito de sodio al 5.25%, por cuatro minutos cada uno. Se utilizó una irrigación final con solución de buffer fosfato (pH=7.2) para remover los restos de EDTA e NaOCl₃ ciclos de 3 min cada uno.

Después, de forma aleatoria se formaron 4 grupos de 5 dientes cada uno los cuales fueron colocados en bolsas para ser esterilizadas en autoclave por 20 minutos a 121°C.

En tubos de ensayo se colocaron 15 ml de medios de infusión cerebro corazón (BHI) Sabourau dextrosa (SD) y en otro una mezcla de 75%BHI y 25% de SD en

los cuales se iban a inocular los microorganismos 1) control de esterilidad 2) *E. Faecalis* 3) *C. albicans* y 4) *E. Faecalis* y *C. albicans* y en cada uno de los tubos se sumergieron las raíces de la muestra de dientes en los cuales se hicieron cada 48 horas recambio durante 3 semanas de medios y reinoculación de microorganismos en cada recambio se realizaba una tinción de Gram para ser analizada en el microscopio óptico.

4.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA MEDIANTE MEB

Al ser extraídas las muestras de los sistemas, fueron lavadas tres veces con solución buffer fosfato 0.1 M (HYCEL de México, S.A. de C.V.) y colocadas en 10 ml de glutaraldehído 2% (SIGMA-ALDRICH) preparado para microscopía electrónica, con 10 ml de colorante azul de alciano 8GX (SIGMA-ALDRICH) al 1% con un pH 2.5 y se almacenaron selladas con Parafilm durante 24 horas a 4°C.

Una vez fijadas, las muestras fueron lavadas con solución buffer fosfato para eliminar el exceso de colorante, y llevadas al proceso de deshidratación por medio de alcoholes crecientes, etanol anhidro reactivo (Fermont, México) al 20%, 40%, 60%, 80%, 90% y 95% durante 10 minutos en cada uno de ellos para finalmente ser almacenadas en alcohol al 99.98%, hasta ser llevadas al proceso de secado de punto crítico de CO₂.

Las muestras para ser colocadas en las cápsulas, son sumergidas en acetona al 100% (J.T. Baker) sin entrar en contacto con el ambiente para poder realizar el procedimiento; ya colocadas en las capsulas son llevadas al equipo de punto crítico de CO₂ (Critical Point Dryer CPD 020 Balzers Union) con 7 intercambios de CO₂, con una duración aproximada de 2 horas., ya que finalizó el intercambio de Acetona por CO₂, las muestras fueron retiradas del equipo y colocadas en tubos Eppendorf herméticamente sellados, y se introdujeron en un desecador al vacío con sílica desecante hasta su preparación para la lectura al microscopio electrónico de barrido. Este procedimiento fue realizado en el departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Las muestras fueron colocadas y selladas con cinta de carbón en dispositivos de lectura con placas de doble carbón, para recubrirse con oro en (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100).

Las muestras fueron leídas en el microscopio electrónico de barrido (Philips XL 30, EEUU) a bajo kilovoltaje (5 Kv) y magnificación variable, con apoyo del PhD ----- Aragón, en el Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

4.5 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se emplearon estadística descriptiva y comparativa usando la prueba de ANOVA de un factor con corrección de Tukey usando el software Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS v.20, se contrastó la formación de biopelícula en los tiempos 24 y 48 h entre los diferentes medios empleados, por cada microorganismo ensayado de forma independiente así como la mezcla de los mismos a las diferentes concentraciones usadas.

5 RESULTADOS

Para nuestra formación de biopelícula de *C. albicans* y *E. faecalis*, dichos microorganismos fueron obtenidos de aislados clínicos y para comprobar que estos eran los microorganismos que nosotros requeríamos, se realizaron pruebas bioquímicas y también se analizó bajo histomorfología con una tinción de Gram, en el caso de *candida* pudimos observar levadura basada en tamaño y tinción de igual manera *E. faecalis* se observaba agrupaciones de pequeños cocos como se muestran (Figura 9 y **Figura 10**).



Figura 9. Análisis de la cepa madre mediante histomorfología de *C. albicans*. Bajo microscopia de luz a 100x se observan la presencia de células levaduriformes.

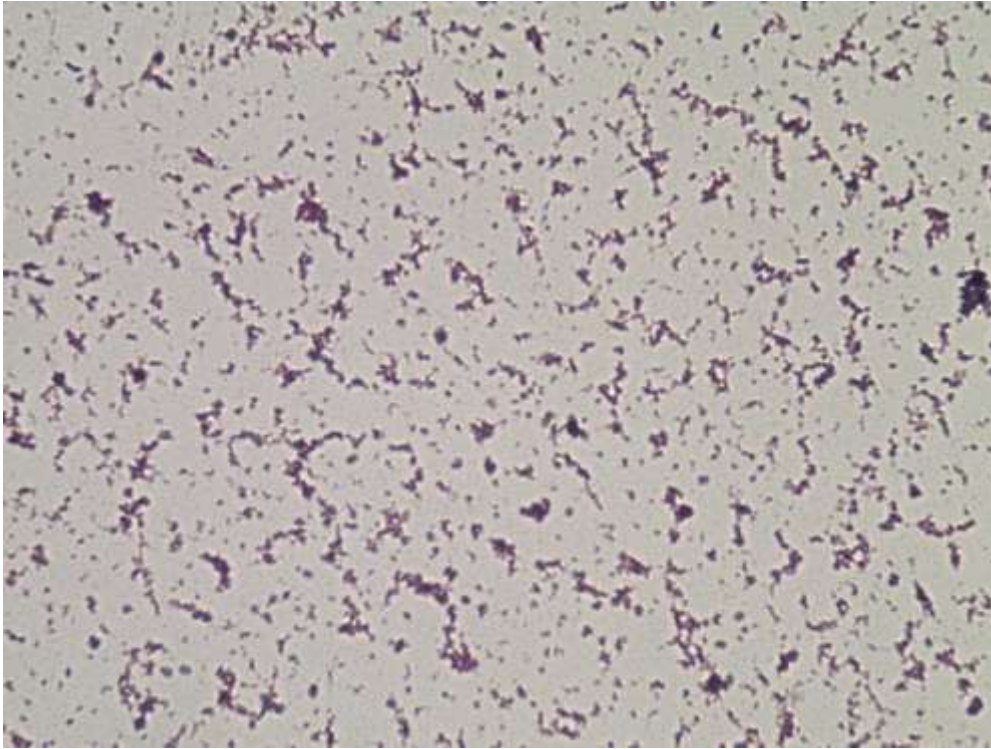


Figura 10. Análisis histomorfológico de la bacteria *Enterococos Faecalis*.
Bajo microscopia óptica a 100x podemos observar la presencia de cocos.

5.1 RESULTADOS *IN VITRO* EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

El crecimiento de dos microorganismos puede resultar conveniente o inconveniente si se realiza la inoculación juntos o de manera separada, por ello realizamos medición y comparación de cada uno de manera individual así como en conjunto.

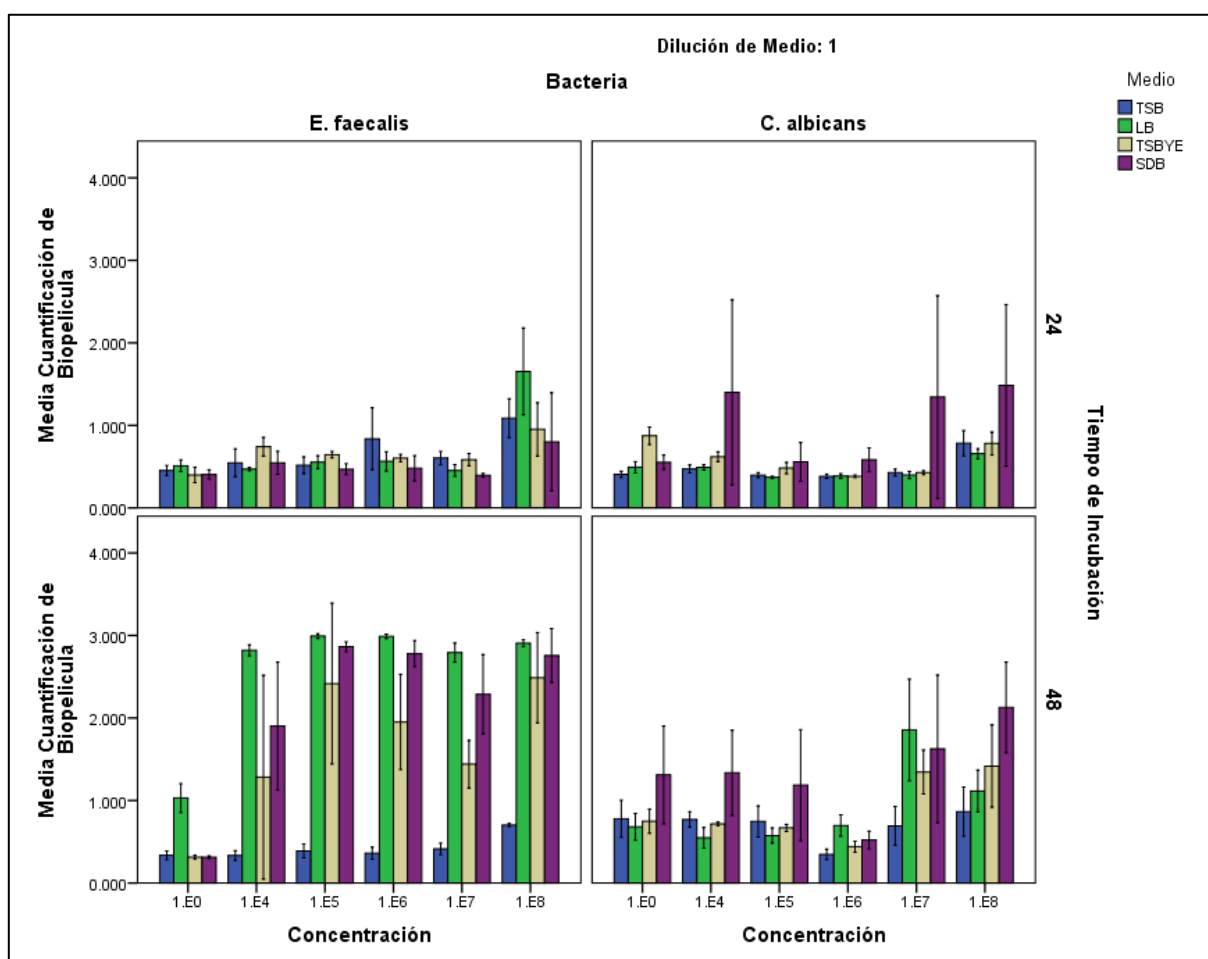
Una vez evaluada la formación de biopelícula de *Enterococos faecalis* a 24 horas encontramos que en la inoculación 1:1 en medio LB observamos mayor crecimiento de biopelícula estadísticamente significativa comparada con los medios SDB, TSB y TSB+EL; entre dichos medios no hubo crecimiento estadísticamente significativo.

En el cultivo de *E. faecalis* en el medio de TSB a las 48 horas mostró un crecimiento menor estadísticamente significativo con el resto de los grupos. Observamos mayor crecimiento de biopelícula en los medios de SDB y LB a 48 horas.

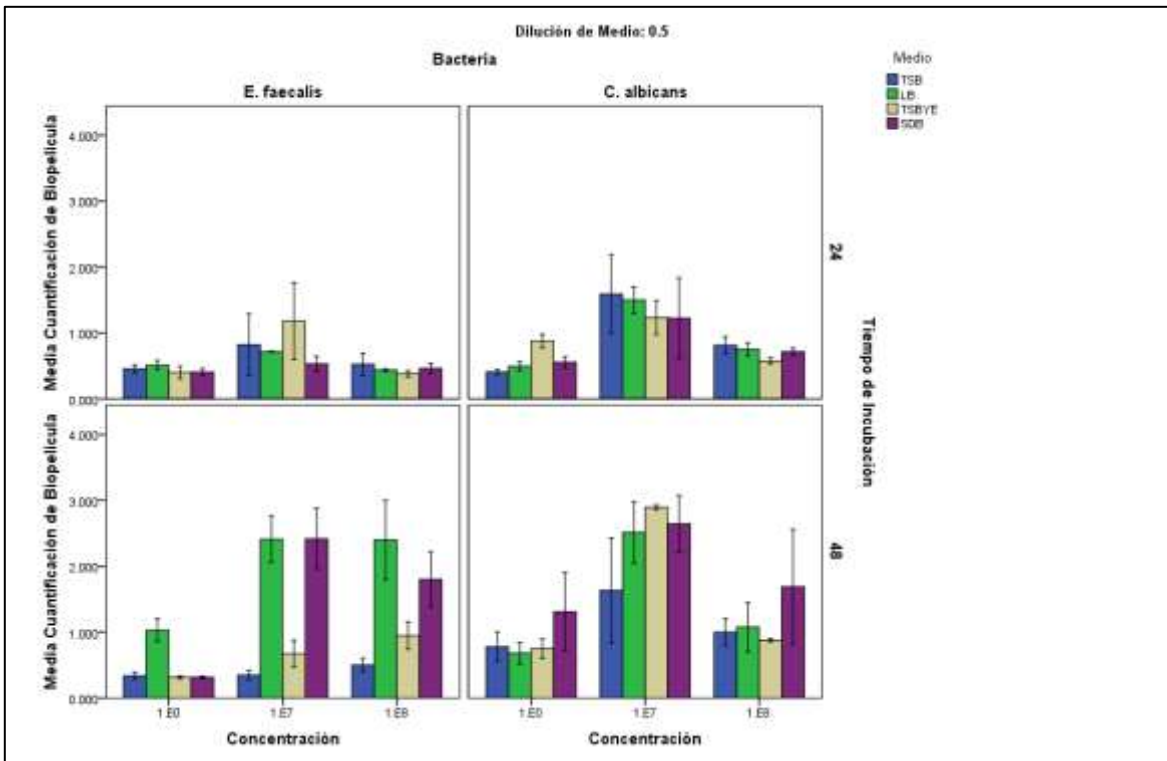
En la inoculación de 1:0.5 de *E. faecalis* a las 24 horas, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a crecimiento y desarrollo de biopelícula en los medios de cultivo, a diferencia de la lectura a las 48 horas donde los medios de TSB y SDB.

En los estudios estadísticos de *C. albicans* en la dilución 1:1 se observó un crecimiento significativo del SDB a las 24 y 48 horas comparado con el resto de

los grupos de medios de cultivo. En cuanto los grupos de TSB, LB y TSB + EL, no se observó diferencia significativa a las 24 horas, a las 48 horas si se percibió mayor crecimiento en medio TSB + EL y LB comparado con TSB; por lo cual se asocia el crecimiento potencializado al adicionar el Extracto de levadura (**Gráfica 1**).

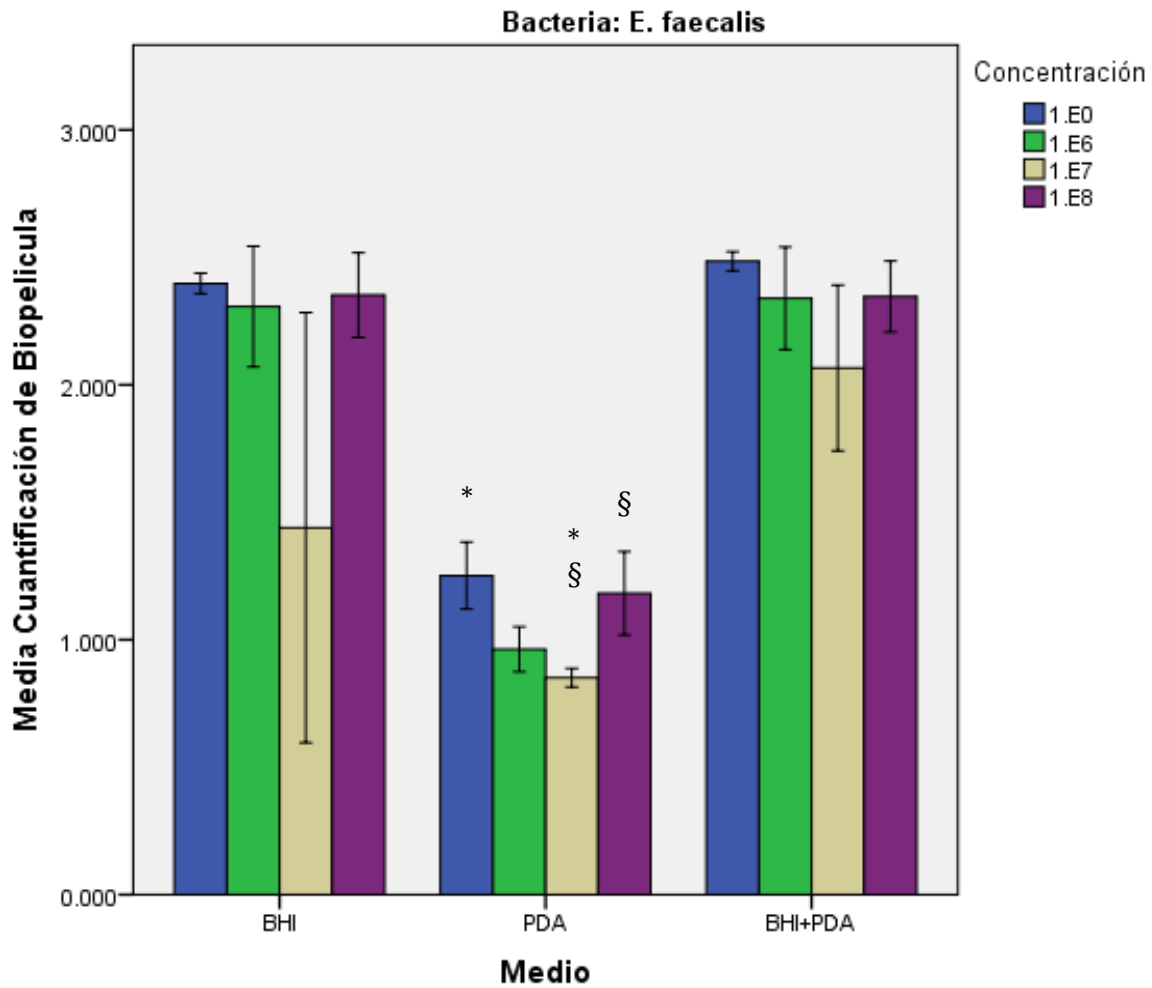


Gráfica 1. Crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans* en dilución de medios de cultivo a 1. Se empleó caldo Triptona-Soja (TSB), Luria Bertani (LB), caldo Triptona-Soja adicionado con extracto de levadura (TSB +EL), Agar dextrosa papa (PDA) cultivado a 24 y 48 horas.



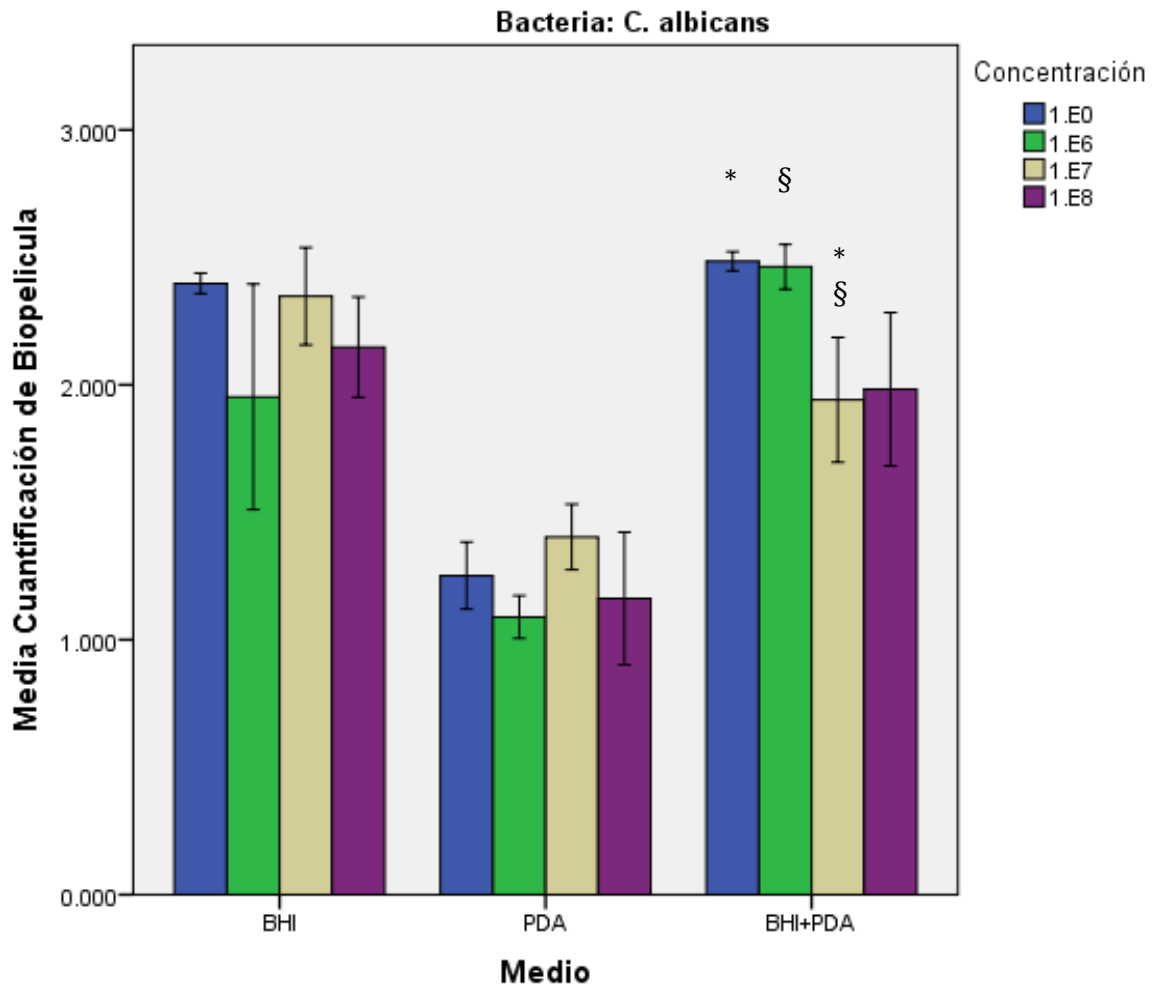
Gráfica 2. Crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans* en dilución de medio a 0.5. Se empleó Triptona-Soja (TSB), Luria Bertani (LB), caldo Triptona-Soja adicionado con extracto de levadura (TSB +EL), Agar dextrosa papa (PDA) cultivado a 24 y 48 horas.

En el ensayo de formación *in vitro* de biopelícula de *E. faecalis* en los medios de BHI y BHI +PDB se observó mayor formación de biopelícula comparada con el medio PDB, por ende asumimos que el medio BHI es una excelente elección en lo que respecta a formación de biopelícula de bacterias como *E. faecalis*. En cuestión de diluciones de cultivo de bacteria no existió una diferencia estadísticamente significativa (**Gráfica 3**).



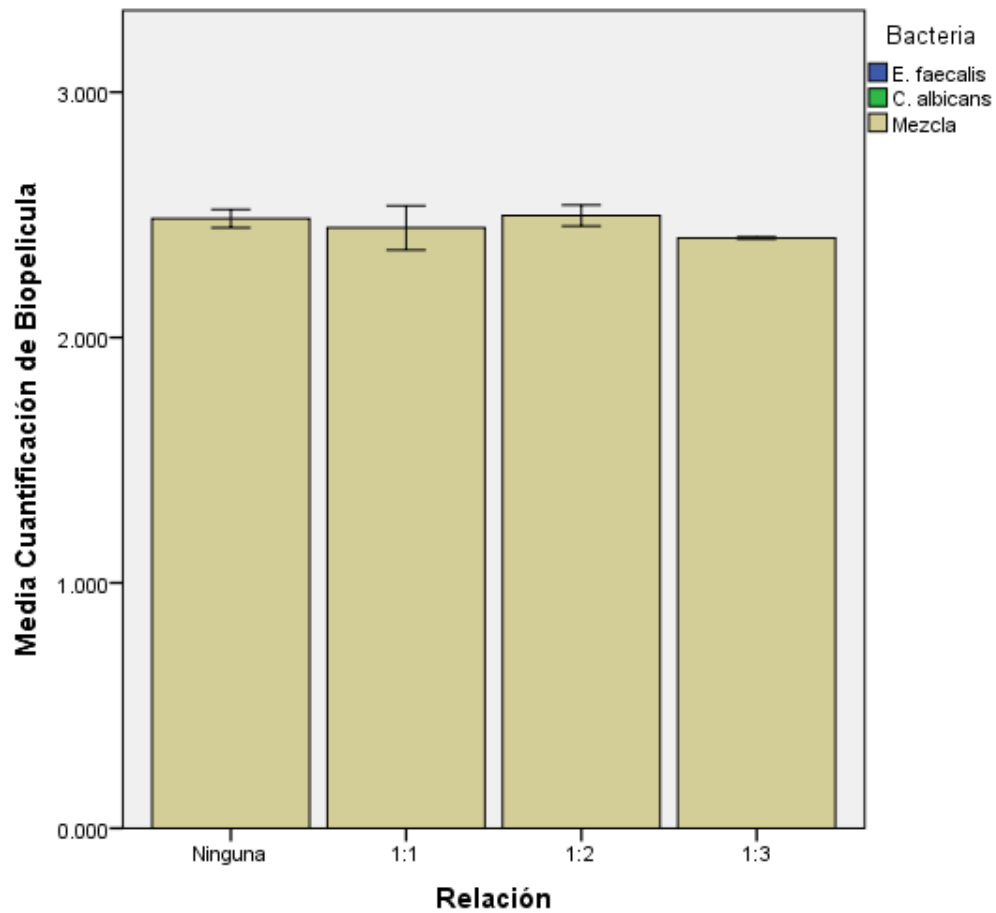
Gráfica 3. Crecimiento de *E. faecalis* a 48 horas. Se empleó medio: Infusión Cerebro Corazón (BHI), Caldo Dextrosa Papa (PDB), Mixto (BHI 75% + PDB 25%) *p = 0.012. § p = 0.032.

Al realizar el ensayo *in vitro* de *C. albicans* en medios BHI, PDB y BHI + PDB se logró observar un mejor crecimiento de biopelícula en medio BHI y BHI + PDB comparado con el PDB. Al comparar los medios de BHI y BHI + PDB no existió una diferencia significativa entre ambos grupos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Crecimiento de *C. albicans* a 48 horas. Se empleó medio: Infusión Cerebro Corazón (BHI), Caldo Dextrosa papa (PDB), Mixto (BHI 75% + PDB 25%) *p = 0.042. § p = 0.050.

Por otra parte una vez seleccionado el medio ideal, que fue la combinación de 75% de infusión cerebro corazón (BHI) más 25 % de caldo dextrosa papa (PDB), al comparar las proporciones de inoculación de *E. faecalis* y *C. albicans* no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto formación de biopelícula, como se muestra en la (**Gráfica 5**).



Gráfica 5. Crecimiento de biopelícula con relación a la proporción de *E. faecalis* y *C. albicans*. Se incubaron proporciones aumentadas 1:1, 1:2 y 1:3 en medio compuesto por BHI+PDB (75%+25%), respectivamente.

5.2 RESULTADOS *EX VIVO* EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Durante cada uno de los recambios se observaron imágenes obtenidas con tinción de Gram y vistas al microscopio óptico para poder llevar un seguimiento de cada uno de los microorganismos de manera individual *E. faecalis* y *C. albicans* como se observan en las (Figura 11 y **Figura 12**), de igual forma para la combinación de ambos microorganismos (**Figura 13**).

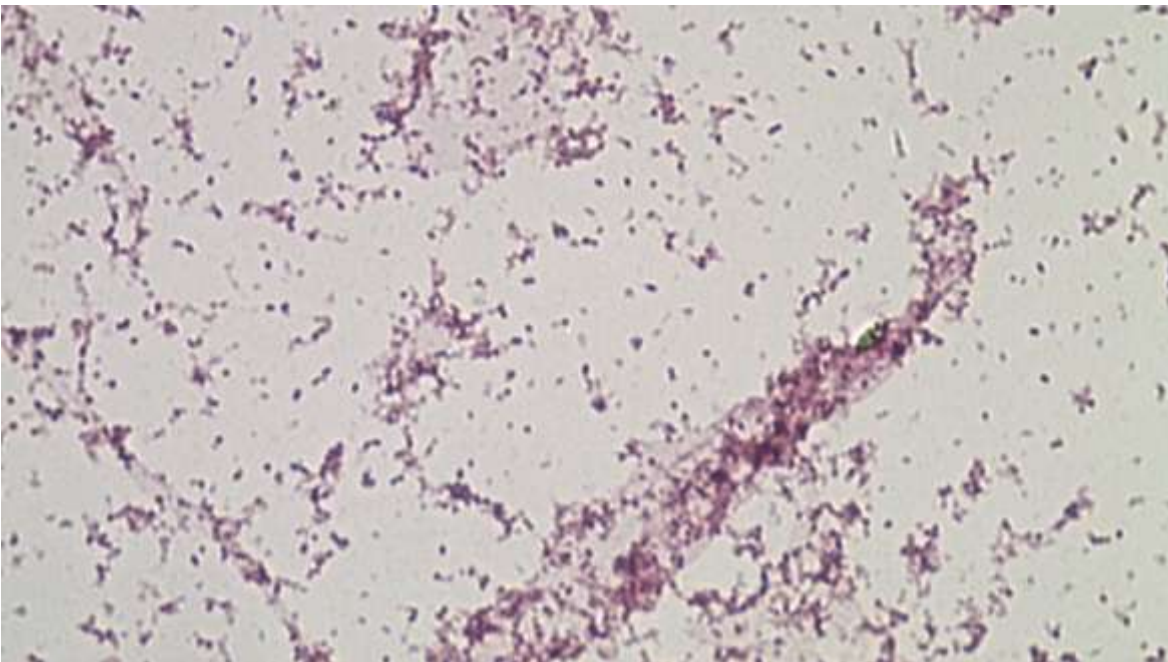


Figura 11. Sobrenadante del cultivo de *E. Faecalis* a 21 días.



Figura 12. Sobrenadante del cultivo de *Cándida albicans* a 21 días. Se observa bajo microscopio óptico a un objetivo de 100x, una gran cantidad de células levaduriformes.

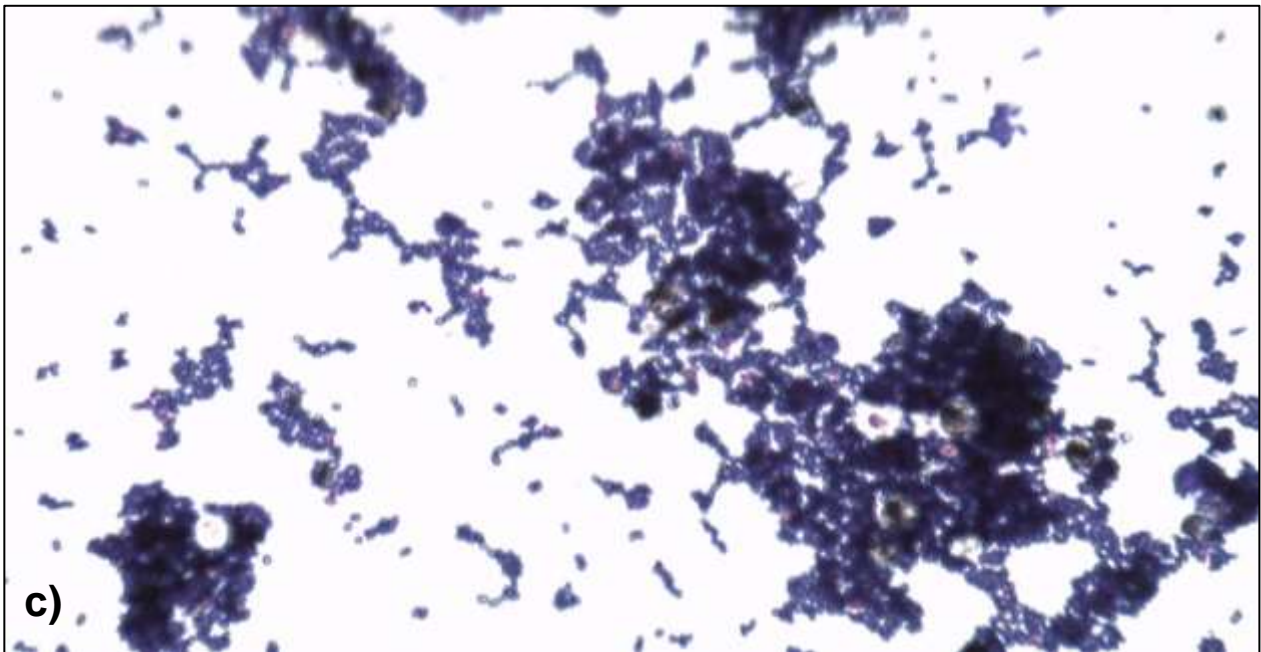
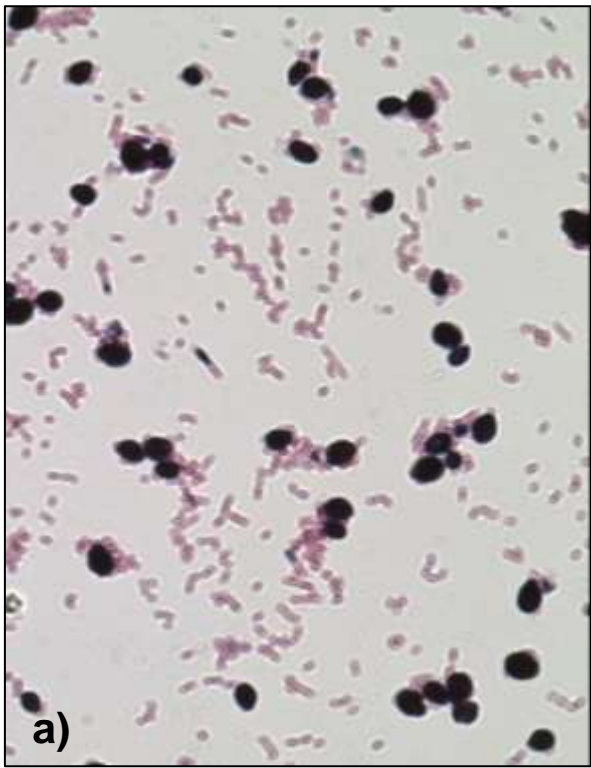


Figura 13. Tinción de Gram de *C. albicans* y *E. faecalis*: a) 72 horas, b) 7 días y c) 21 días de incubación. Se observa que conforme aumenta el tiempo de incubación incrementa el crecimiento de los microorganismos.

Al analizar bajo microscopio electrónico de barrido los grupos a) control, b) *E. faecalis*, c) *C. albicans*, d) mixto de (ambos microorganismos). En el grupo de control de esterilidad (**Figura 14**), observamos los túbulos dentinarios la dentina permeable y libre de presencia de microorganismo, por ende se mantuvo estéril los dientes sumergidos en los grupos. En el grupo de *E. faecalis* se observó un crecimiento de cocos formando una biopelícula a los 7 días solo había bacterias en estado planctónico (**Figura 16**) y a los 21 se observó (**Figura 18**) formación y maduración de la biopelícula donde se ve aumento de número de capas de microorganismo. En el grupo de *C. albicans* a los 7 días (**Figura 15**) hubo un crecimiento más lento en comparación con el de *faecalis* (Figura 19), pero de igual forma a los 21 días se aprecia una formación de una biopelícula, en el cuarto y último grupo de formación de biopelícula mezclado con ambos microorganismos nuestros resultados finales fueron aceptables (**Figura 20**) donde se cree que la presencia de 2 o más microorganismos puede llegar hacer beneficiario para los pobladores de la biopelícula.

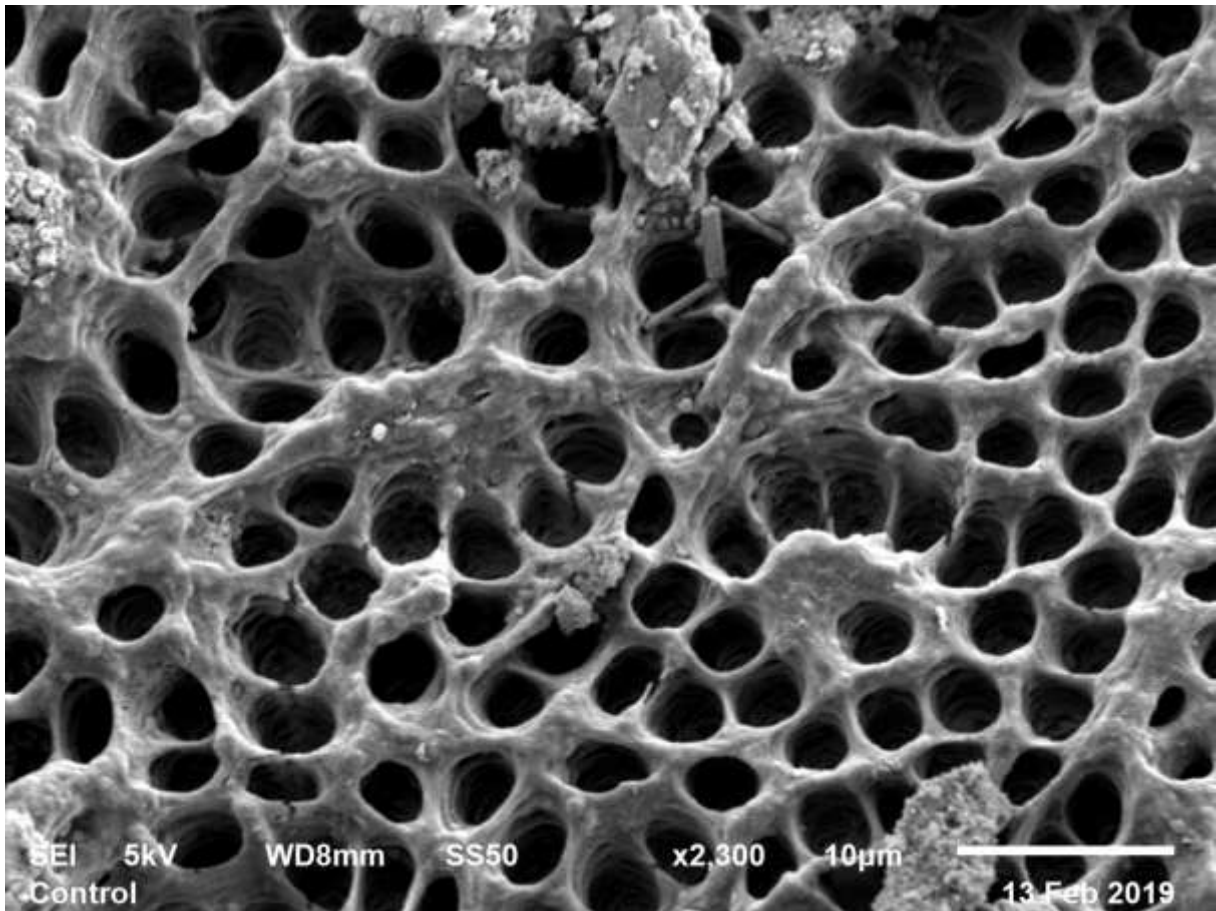


Figura 14. MEB del grupo control. Se muestra una permeabilidad dentinaria y la ausencia de microorganismos a 2300x.

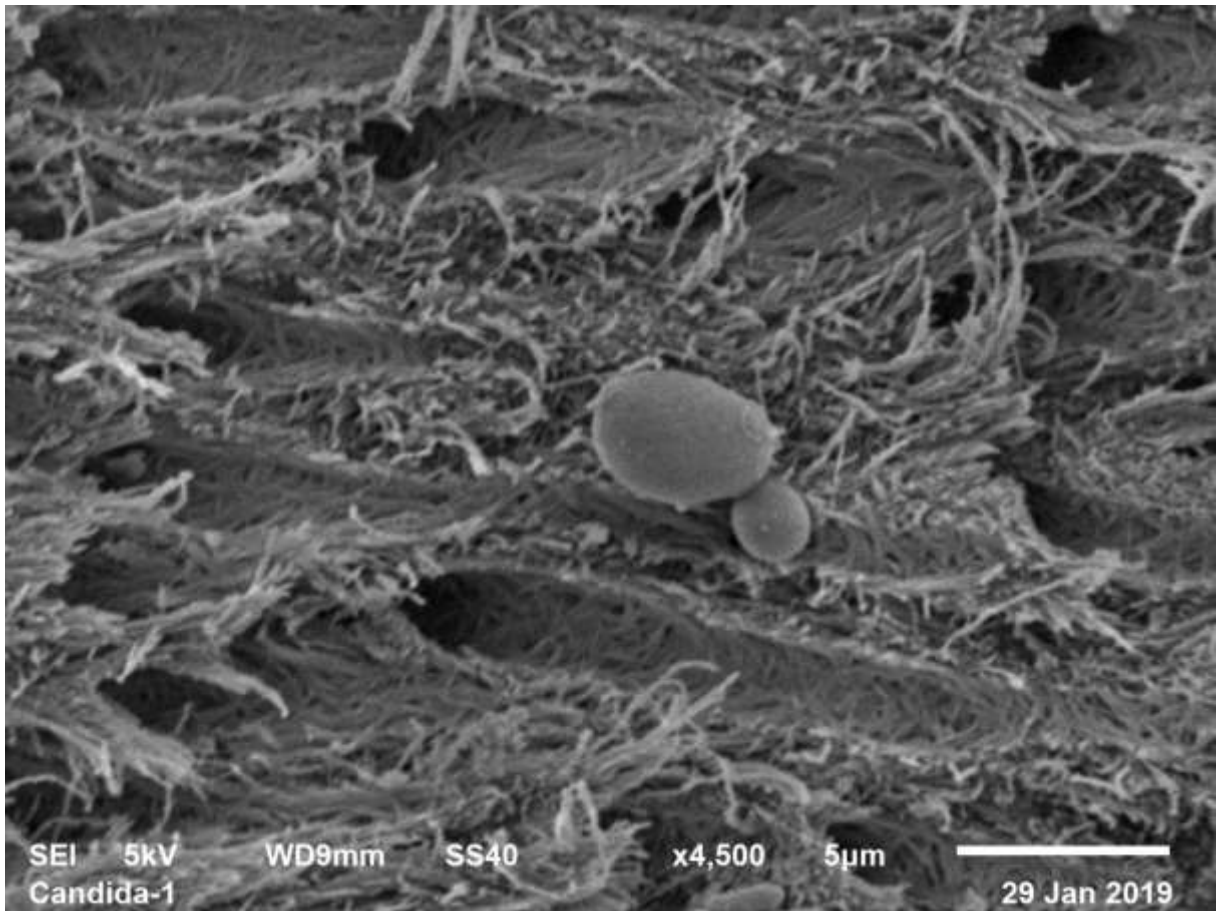


Figura 15. *C. albicans* incubada a 7 días. Se observan células aisladas en estado planctónico.

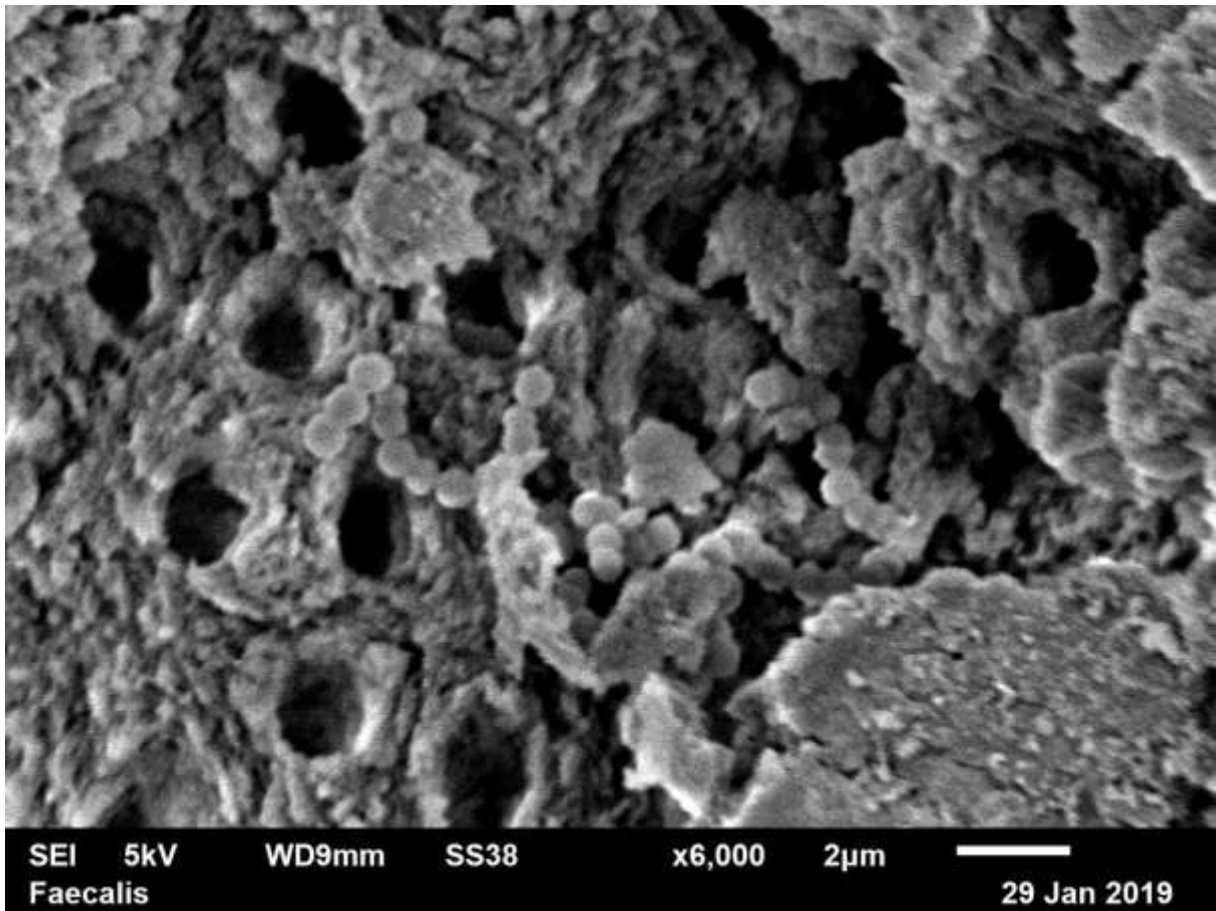


Figura 16 *E. faecalis* incubado a 7 días. Podemos observar el inicio de la formación de una biopelícula en estado inmaduro.

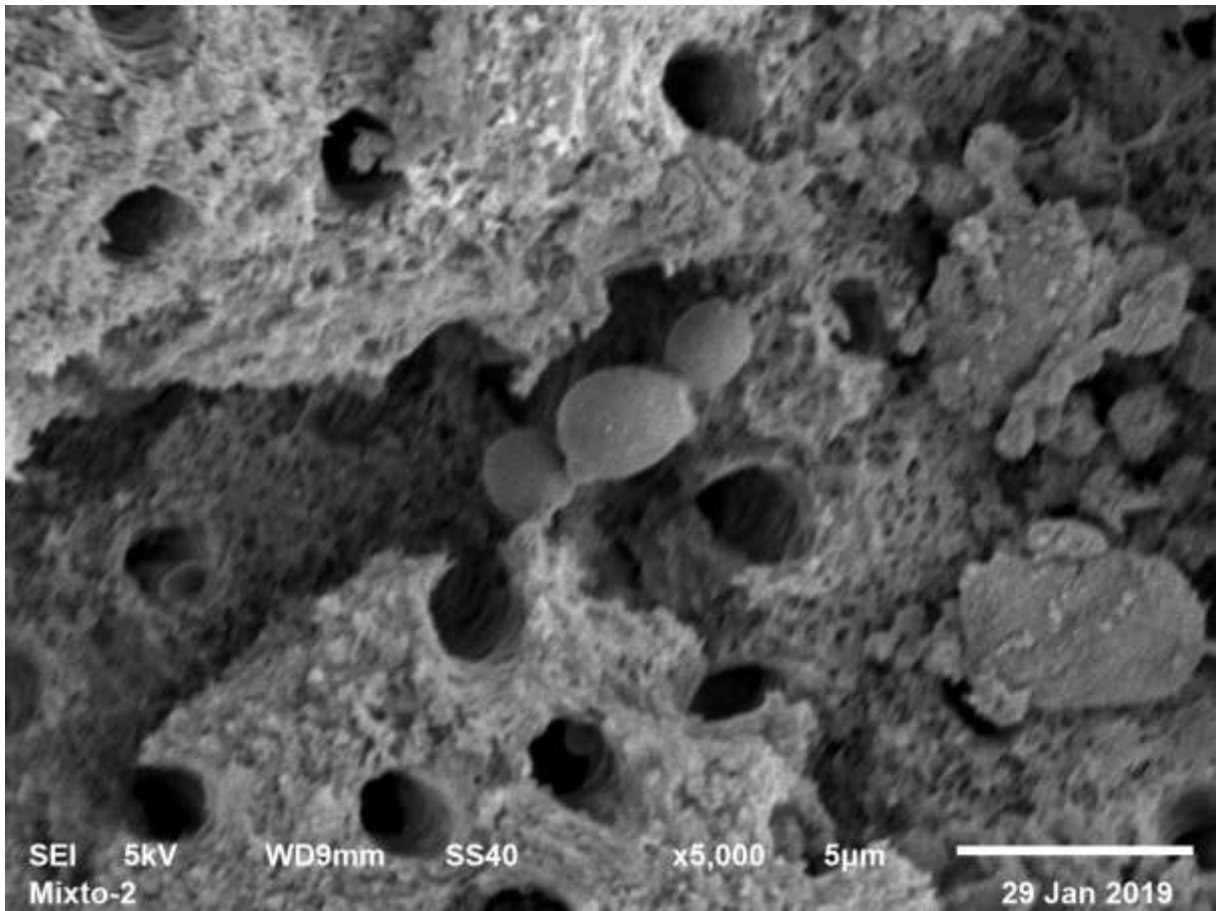


Figura 17. Biopelícula mixta a 7 días de incubación. Formado por *E. faecalis* y *C. albicans*. Se observan algunos cocos y levaduras en estados planctónico.

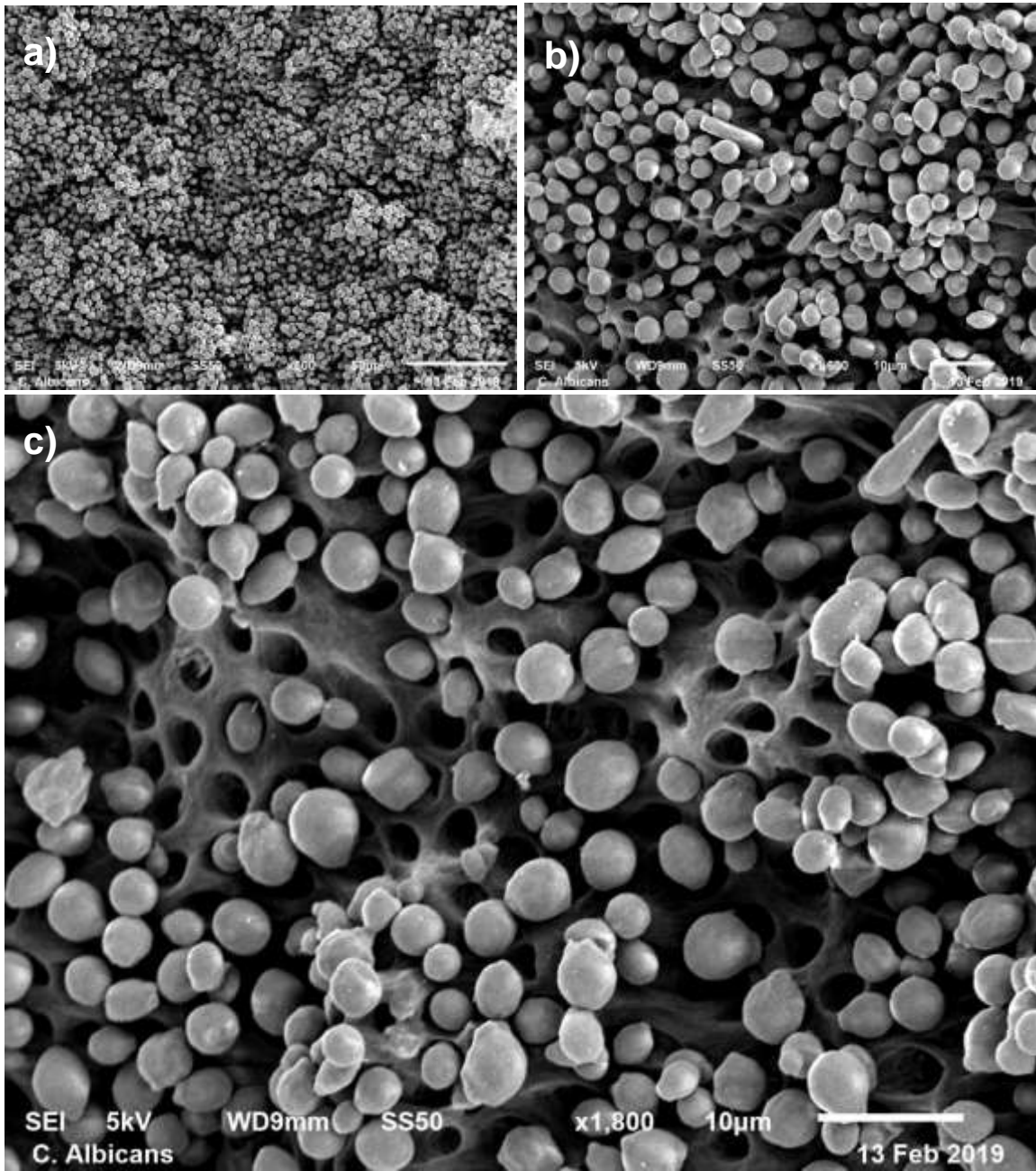


Figura 18. Biopelícula madura de *C. albicans* a 21 días de incubación; A) Se observa la recubierta de la dentina de levaduras a 500x; **b)** Se observa el cambio morfológico a estado de hifas, a 1600x; **C)** Se observan levaduras en periodos de gemación a 1800x.

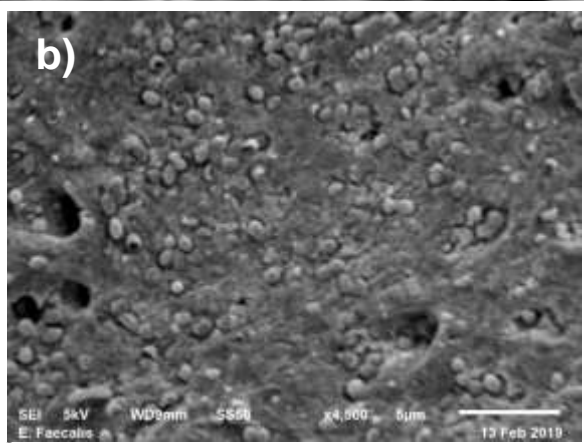
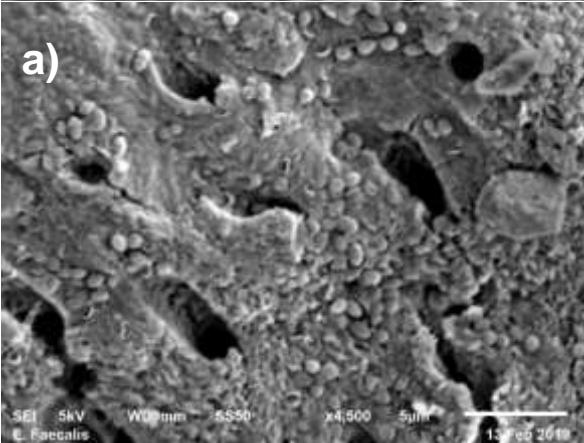
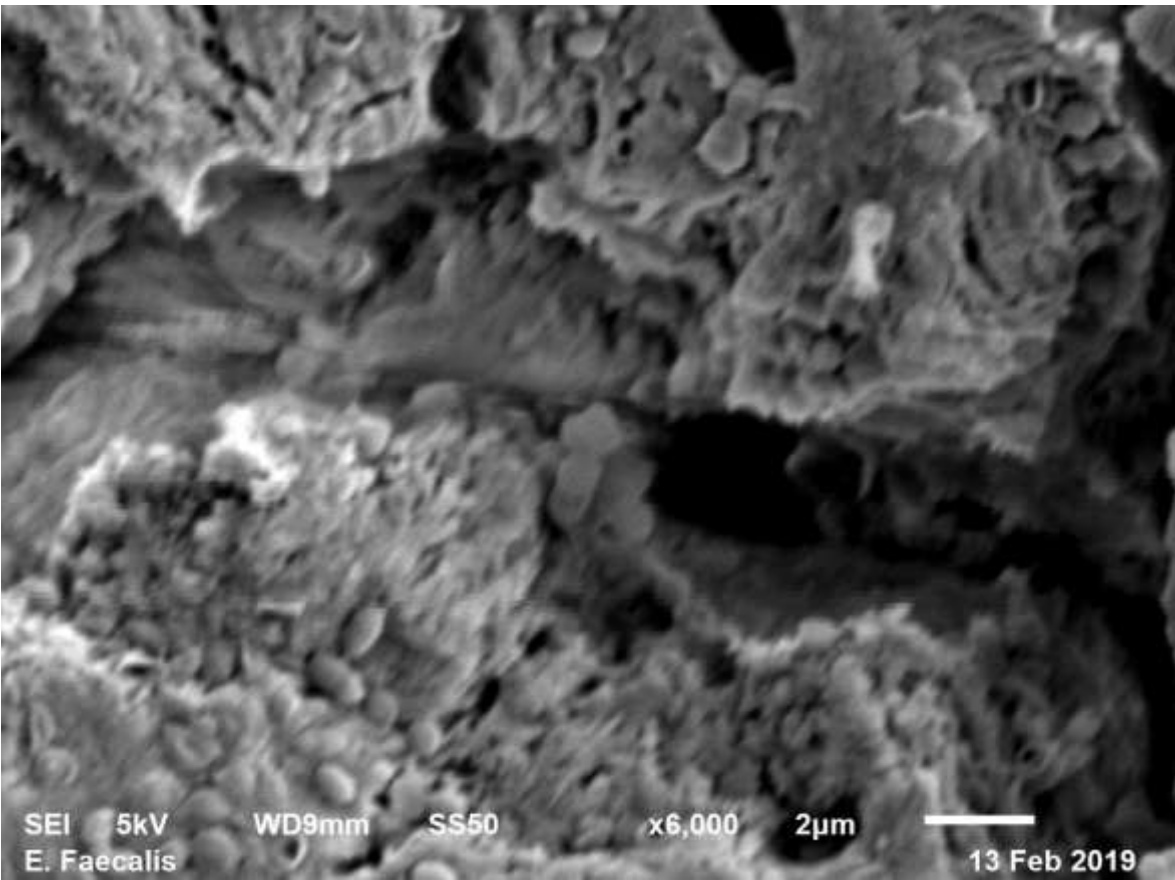


Figura 19. Biopelícula madura de *E. faecalis*. A y B) Observamos una cubierta de las entradas de los túbulos dentinarios a 4500 x. **C)** Podemos observar la colonización de la bacteria dentro del túbulo dentinario a 6000x.

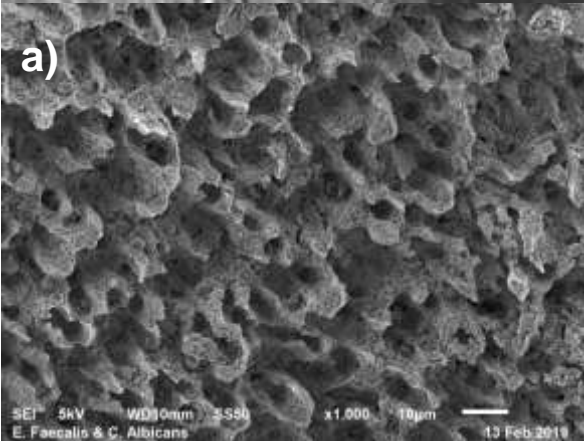
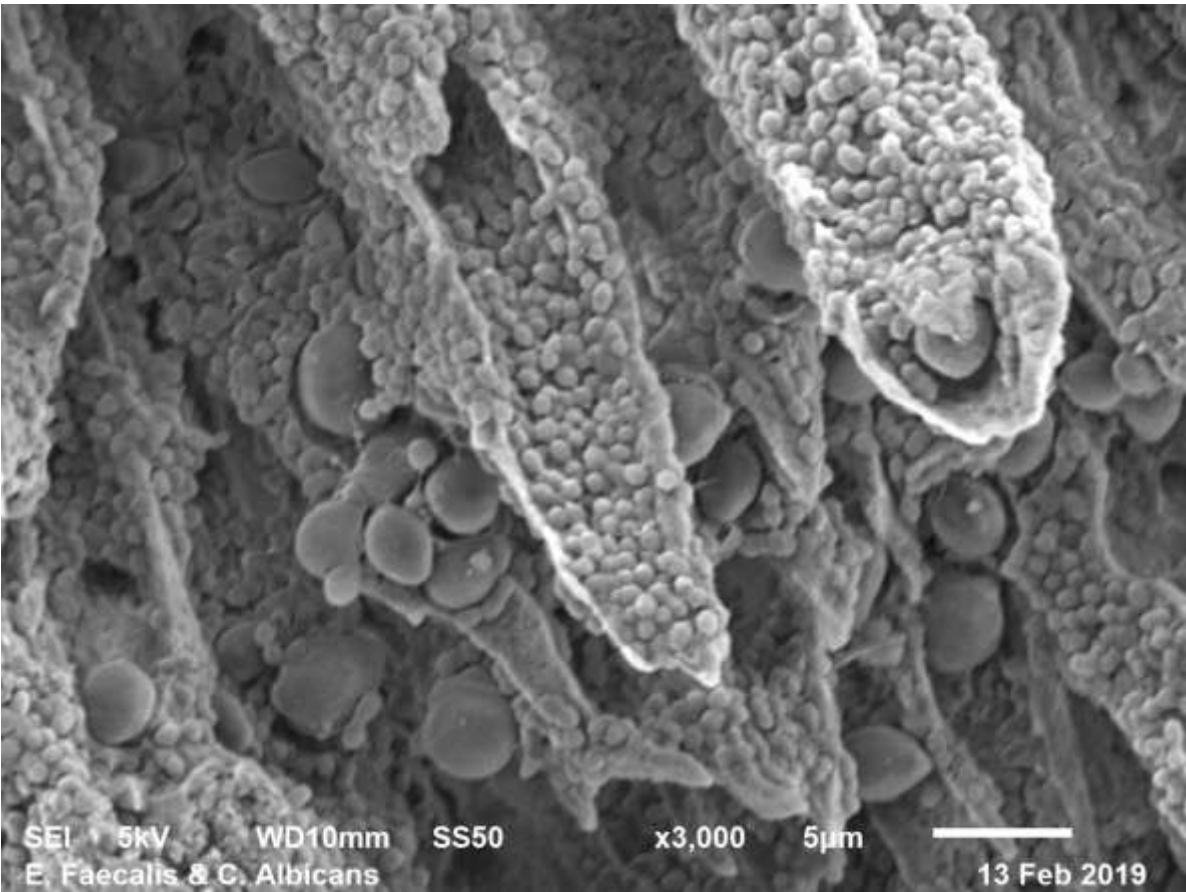


Figura 20. Biopelícula madura de *E. faecalis* y *C. albicans* a 21 días. A) Podemos observar como la parte interna del conducto radicular está poblado por levaduras y bacterias en estado de biopelícula 1000x **B)** podemos observar cómo los túbulos dentinarios tienen incrustados cocos y a sus alrededores algunas levaduras, 1900x. **C)** Se aprecian detalladamente los microorganismos habitantes de la biopelícula radicular 3000x.

6 DISCUSIÓN

Estrela y Col. (2009), analizó mediante SEM que el modelo de biopelícula de *E. faecalis* es un modelo prometedor para evaluar el potencial antimicrobiano de los medicamentos endodónticos. Los tercios coronal y medio mostraron significativamente más áreas cubiertas por *E. faecalis* que el tercio apical ($p < 0.05$) contrastando nuestros resultados no se observó diferencia significativa en áreas de formación de biopelícula, entre los tercios del conducto radicular (63).

Ramage y Col. (2001) realizó la formación reproducible de biopelículas en diferentes biomateriales discos, bajo cizallamiento fuerzas con un flujo de recambios de nutrientes, igualando así Las condiciones fisiológicas encontradas por los microorganismos en el hospedador, la cual la comparo mediante SEM y CLS. De igual forma coincidimos de los excelentes resultados que se obtienen en formación de biopelícula mediante cultivos en flujo, pero se propone realizar estudios de CLS (52).

Las investigaciones de Ramage y Wickes (2008), indican que las biopelículas de *C. albicans* se forman bajo condiciones de flujo canalización y porosidad, mostrando una arquitectura compleja con amplia heterogeneidad espacial y altamente topografía ondulada variable. Además, las biopelículas de *C. albicans* se formaron en condiciones de flujo con reposición de nutrientes poseen mayor grosor que las biopelículas formadas bajo condiciones estáticas. Concordando con nuestros resultados obtenidos en formación de biopelícula (64).

Castrillón y Col. (2013), mencionan “que las biopelículas son el tipo de crecimiento microbiano más común en la naturaleza, participan de manera importante en la aparición de enfermedades y se asocian directamente con los problemas de resistencia hacia los antimicrobianos” para ello realizaron ensayos en formación de biopelícula de *Cándida albicans* causantes de candidiasis. De igual manera coincidimos que la biopelícula muestra resistencia a los medicamentos e irrigantes utilizados en endodoncia, pero aún faltan estudios por realizar (65).

Díez y Correa (2017), creó un modelo de biopelícula *in vitro* formado por microorganismos como *E. faecalis*, *C. albicans* y *S. aureus* el cual creció mejor en atmósferas microaerófilas de 10% de CO₂ a 37 °C llegando a la maduración a los 30 días de inoculado. Las inoculaciones mixtas tuvieron un crecimiento más rápido en comparación con las individuales. Posiblemente por el sinergismo entre microorganismos. Nuestro modelo revela que la formación de la biopelícula en el trayecto del conducto se alcanza en 21 días, pero hay estudios que mencionan que biopelículas inmaduras en superficies ocurren después de 15 días. Por el contrario Lasa y pozo (2005), mencionan que la formación de biopelículas maduras se produce en 30 días. Pero existen estudios que revelan la diferencia en periodos de formación y maduración estadísticamente significativa (29, 47).

Comprender la capacidad de estos microorganismos, individual y colectivamente para formar biopelículas dentro del conducto radicular, fomenta un enfoque novedoso de la fisiopatología del proceso infeccioso. Además, proporciona un

modelo in vitro estandarizado que será útil para evaluar el efecto antimicrobiano de los irrigantes, quelantes y soluciones antisépticas en estas biopelículas (29, 63, 66).

Graham y Col. (2017), Demostró en cultivos mixtos que la bacteriocina de *E. faecalis* EntV es potente Inhibidor de el crecimiento de biopelículas de *C. albicans* al evitar el cambio a la forma de hifa coincidiendo con nuestros resultados obtenidos en la biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans* (57, 60, 67).

7 CONCLUSIONES

El medio compuesto por BHI 75% y PDB 25% presentó los mejores resultados en lo que respecta la formación de biopelícula *in vitro* y *ex vivo*, a una dilución de *E. faecalis* y *C. albicans* al 10^8 en una relación 1:2 respectivamente.

Se requieren un mínimo de 72 horas para la formación de una biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans in vitro*, a diferencia del modelo *ex vivo* que requiere 21 días.

Logramos implementar una biopelícula intraconducto de *E. faecalis* y *C. albicans* y el cultivo mixto bajo un modelo de recambios de medios durante un periodo de 21 días.

8 PERSPECTIVAS

A partir de la estandarización de un modelo de biopelícula intraconducto realizado en este trabajo, se plantea el seguimiento futuro de investigaciones en dos líneas.

En el primer término se podría realizar un estudio donde se evalúen diferentes agentes utilizados en la medicación intraconducto, donde se mida el efecto bactericida contra biopelículas presentes dentro del conducto radicular, analizados con microscopía electrónica de barrido y análisis de viabilidad usando microscopia confocal.

Además sería interesante evaluar la capacidad de los nuevos instrumentos presentes en el mercado y que se utilizan durante la terapia endodóntica, analizando cual de esos sistemas rotatorios puede tener mayor capacidad de remover un biopelícula por arrastre mecánico, de igual manera podría ser valorado mediante microscopia electrónica de barrido.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Cook LC, Dunny GM. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(4):1850-6.
2. Chavez de Paz LE, Lemos JA, Wickstrom C, Sedgley CM. Role of (p)ppGpp in biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(5):1627-30.
3. Larsen WJ. *Human embryology*: Churchill Livingstone; 2001.
4. Ruch J. Session I: Development, Form, and Function of Odontoblasts—CD. Torneck, Chairman: Odontoblast Differentiation and the Formation of the Odontoblast Layer. *Journal of dental research*. 1985;64(4):489-98.
5. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of development*. 1997;67(2):111-23.
6. Mattsson CS, Jontell M, Bergenholtz G, Heyden M, Dahlgren U. Distribution of interferon- γ mRNA-positive cells in oral lichen planus lesions. *Journal of oral pathology & medicine*. 1998;27(10):483-8.
7. de Ferraris MEG, Muñoz AC. *Histologa, embriologa e ingeniera tisular bucodental / Histology, embryology and oral tissue engineering*: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2009.

8. Coimbra FC, Salles MM, De Oliveira VC, Macedo AP, Da Silva CH, Pagnano VO, et al. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. *American journal of dentistry*. 2016;29(3):149-53.
9. García Cabrera L, Rodríguez Reyes O, Calzado de Silva M. Bases morfofisiopatológicas de la respuesta inflamatoria aguda pulpar. *Medisan*. 2011;15(11):1647-55.
10. Reyes VV, Páucar MÁ. Reacción de la pulpa dentaria ante la presencia de la caries y los tratamientos dentales. *Odontología sanmarquina*. 2010;13(1):28-31.
11. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Lopes HP, Alves FR, Oliveira JCM, Armada L, et al. Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa viva. *Revista Brasileira de Odontologia*. 2012;68(2):161.
12. Rodríguez P, Calero JA. Microbiología pulpar de dientes íntegros con lesiones apicales de origen idiopático. *Colombia Médica*. 2008;39(1):5-10.
13. Fang Y, Wang X, Zhu J, Su C, Yang Y, Meng L. Influence of Apical Diameter on the Outcome of Regenerative Endodontic Treatment in Teeth with Pulp Necrosis: A Review. *J Endod*. 2017.
14. Miller WD. The microorganisms of the human mouth. The local and general disease which are caused by them. 1890:274-341.
15. Slaton KP, Huffer MD, Wikle EJ, Zhang J, Morrow CD, Rhodes SC, et al. 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing to Evaluate the Effects of 6 Commonly Prescribed Antibiotics. *J Endod*. 2017;43(12):1984-9.

16. Haapasalo M. Bacteroides spp. in dental root canal infections. Dental Traumatology. 1989;5(1):1-10.
17. Sakko M, Tjaderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of Root Canal Infections. Primary dental journal. 2016;5(2):84-9.
18. López Marcos JF. Etiología, clasificación y patogenia de la patología pulpar y periapical. 2004.
19. de Andrade Massara MdL, Junior IMF, Nelson Filho P, de Araújo FB, Percinoto C. terapia pulpar en dientes primarios y permanentes jóvenes.
20. Betancourt Núñez M, Fernández González MdC, Valcarcel Llerandi J. LESIONES PULPARES Y PERIAPICALES EN ESCOLARES DEL AREA DE ATENCION DEL POLICLINICO DOCENTE DE PLAYA. CIUDAD DE LA HABANA. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2009;8:0-.
21. Luckmann G, Dorneles LdC, Grando CP. Etiologia dos insucessos dos tratamentos endodônticos. Vivências. 2013;9(16):133-9.
22. Imura N. Factores de sucesso em endodontia: Análise retrospectiva de 2.000 casos clínicos. 2000.
23. Lima SMdF. Peptídeos antimicrobianos potenciais para terapia endodôntica: análise antimicrobiana, imunológica e osteoclastogênica in vitro. Brasil: Universidade Católica de Brasília; 2014.
24. Ruiz PÁ, de Amorim RFB, Gordón-Núñez MA, Batista de Souza L, de Carvalho RA. Mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis de los

quistes periapicales: Una revisión de los aspectos actuales. Revista de la asociación Dental Mexicana. 2004;61(2):54-8.

25. Kasic S, Knezovic M, Beader N, Gabric D, Malcic AI, Baraba A. Efficacy of Three Different Lasers on Eradication of Enterococcus faecalis and Candida albicans Biofilms in Root Canal System. Photomedicine and laser surgery. 2017;35(7):372-7.

26. Benz K, Markovic L, Jordan RA, Novacek C, Jackowski J. In vitro evaluation of the apical seal of two different retrograde filling materials. Australian Endodontic Journal. 2017;43(1):29-33.

27. Ghivari SB, Bhattacharya H, Bhat KG, Pujar MA. Antimicrobial activity of root canal irrigants against biofilm forming pathogens- An in vitro study. Journal of conservative dentistry : JCD. 2017;20(3):147-51.

28. Nair PR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. Journal of endodontics. 1990;16(12):580-8.

29. Díez Ortega H, Correa Toral F, Delgado Hernández L, Echavarría González C, Serna Varona F, Rodríguez Ciodaro A. Ex vivo model for studying polymicrobial biofilm formation in root canals. Universitas Scientiarum. 2017;22(1):31.

30. Hernández Vigueras S, Salazar Navarrete L, Pérez Tomás R, Segura Egea JJ, Viñas M, López-López J. Virus en Endodoncia. *International journal of odontostomatology*. 2014;8(2):211-4.
31. Nazar C J. Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. 2007;67:161-72.
32. de la Peña SZ, Salcedo-Moncada D, Petkova-Gueorguieva M, Huasupoma MV. Biofilm en Endodoncia: una revisión. *Odontología Sanmarquina*.19(2):45-9.
33. Díaz A. Aspectos relevantes de *Enterococcus Faecalis* y su participación en las infecciones de origen endodóntico”. *Carlos Bóveda*. 2008.
34. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Dental Traumatology*. 1990;6(2):73-7.
35. Jucht D, Rujano R, Romero M, Rondón L. Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclínica*. 2014:101-23.
36. Bachtiar EW, Bachtiar BM, Dewiyani S, Surono Akbar SM. *Enterococcus faecalis* with capsule polysaccharides type 2 and biofilm-forming capacity in Indonesians requiring endodontic treatment. *J Investig Clin Dent*. 2015;6(3):197-205.
37. Bulacio Mde L, Galvan LR, Gaudio C, Cangemi R, Erimbaue MI. *Enterococcus Faecalis* Biofilm. Formation and Development in Vitro Observed by Scanning Electron Microscopy. *Acta Odontol Latinoam*. 2015;28(3):210-4.

38. Winfred SB, Meiyazagan G, Panda JJ, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan VS, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent.* 2014;8(2):254-60.
39. BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Sciences.* 1981;89(4):321-8.
40. Veras HN, Rodrigues FF, Botelho MA, Menezes IR, Coutinho HD, da Costa JG. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. *TheScientificWorldJournal.* 2014;2014:471580.
41. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Navarro-Escobar E, de Freitas MF, Baca P. Antimicrobial activity and enterococcus faecalis biofilm formation on chlorhexidine varnishes. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17(4):e705-9.
42. Zhang R, Chen M, Lu Y, Guo X, Qiao F, Wu L. Antibacterial and residual antimicrobial activities against *Enterococcus faecalis* biofilm: A comparison between EDTA, chlorhexidine, cetrimide, MTAD and QMix. *Scientific reports.* 2015;5:12944.
43. Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress

associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J*. 2015;48(3):210-9.

44. Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, et al. Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC oral health*. 2014;14:132.

45. Tay CX, Quah SY, Lui JN, Yu VS, Tan KS. Matrix Metalloproteinase Inhibitor as an Antimicrobial Agent to Eradicate *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod*. 2015;41(6):858-63.

46. Chong KKL, Tay WH, Janela B, Yong AMH, Liew TH, Madden L, et al. *Enterococcus faecalis* modulates immune activation and slows healing during wound infection. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(12):1644-54.

47. Lasa I, Pozo JLd, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005;28:163-75.

48. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*. 2007;33(7):815-8.

49. Sandoe JA, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(4):767-70.

50. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic cell*. 2005;4(4):633-8.

51. Desai JV, Mitchell AP. *Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control. *Microbiol Spectr*. 2015;3(3).
52. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*. 2001;18(4):163-70.
53. Febres MMG, González L, Mendoza V, Ochoa M, Castrillo S, Sánchez J, et al. Capacidad de formación de biopelículas en especies del género *Candida* de procedencia clínica. *Revista Médica de Risaralda*. 2018;23(2):4-9.
54. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(11):3839-46.
55. Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses*. 2015;58(12):719-27.
56. Yoo YJ, Perinpanayagam H. Endodontic biofilms: contemporary and future treatment options. *Restorative dentistry & endodontics*. 2019;44(1):e7.
57. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*. 2011;10(9):1173-82.
58. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*. 2006;39(11):878-85.

59. Harding MW, Marques LL, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in microbiology*. 2009;17(11):475-80.
60. Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. 2017;114(17):4507-12.
61. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, Savić V, Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*. 2004;38(5):428-32.
62. Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Research in microbiology*. 2007;158(4):386-92.
63. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRdA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *Journal of Applied Oral Science*. 2009;17(2):87-91.
64. Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Revista iberoamericana de micología*. 2008;25(1):37.
65. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes MdC. Biopelículas fúngicas. *Dermatología Revista Mexicana*. 2013;57(5):350-61.

66. Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of dental research*. 2001;80(1):363-70.
67. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(2):348-76.