



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTOS DE ODONTOLOGÍA  
CONSERVADORA Y PATOLOGÍA**

**“PRESENCIA DE *Enterococcus faecalis* EN DIENTES CON DIAGNÓSTICO DE  
PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA”**

**Jacqueline Andrea Armijo Pérez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA  
FINANCIAMIENTO: PROYECTO FIOUCH 09-04**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof<sup>a</sup>. Nora Silva Steffens**

**TUTORES ASOCIADOS  
Dra. Silvana Maggiolo Villalobos  
Prof.Dr. Erik Dreyer Arroyo**

**Santiago – Chile  
2011**

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a mi familia y amigos que me acompañaron y apoyaron durante el transcurso de mis estudios.

A la profesora Nora Silva Steffens por hacerme parte de su equipo de trabajo, transmitirme sus conocimientos, y entregarme todo su cariño.

A los doctores Silvana Maggiolo, Erik Dreyer y Mauricio Garrido por su paciencia y dedicación en el desarrollo de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>Pág.</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2.1 Marco teórico.....	2-3
2.1.1. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	4-8
2.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> y su relación con la PAA.....	8-9
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
3.1. Hipótesis .....	10
3.2. Objetivo general.....	10
3.3. Objetivos específicos .....	10
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1. Tipo de estudio.....	11
4.2. Grupo de estudio .....	11
4.3. Obtención de las muestras .....	12-13
4.4. Procesamiento microbiológico .....	14
4.4.1. Cultivo microbiológico e identificación .....	14
4.5. Procesamiento molecular .....	15
4.5.1. Extracción de DNA .....	15
4.5.2. Técnica de PCR .....	15-16
4.5.3. Electroforesis.....	17
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. Identificación de <i>E.faecalis</i> mediante microbiología clásica .....	18-20
5.2. Identificación de <i>E.faecalis</i> mediante microbiología molecular.....	21-22
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	23-25
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	25
<b>8. SUGERENCIA</b> .....	25
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26-33
<b>10. ANEXOS</b>	
10.1. Anexo 1: Consentimiento informado.....	34
10.2. Anexo 2: Acta de aprobación del Comité de Ética.....	35-36
10.3. Anexo 3: Acta de aprobación del Comité de Bioseguridad.....	37
10.4. Anexo 4: Ficha clínica.....	38

## 1. RESUMEN

**Introducción:** *E. faecalis* es un microorganismo anaerobio facultativo, Gram positivo, que forma parte de la microbiota normal de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, forma biofilm, presenta resistencia a factores del sistema inmune y antimicrobianos. Se aísla con mayor frecuencia en fracasos endodónticos y ocasionalmente en infecciones endodónticas primarias como la Periodontitis Apical Asintomática (PAA). Su característica principal es la sobrevivencia en ecosistemas empobrecidos.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *E. faecalis* en dientes con diagnóstico de PAA.

**Material y Método:** La muestra en estudio se conformó por 30 pacientes con un diente unirradicular con diagnóstico de PAA. De cada uno de ellos se obtuvo una muestra microbiológica con el método de Schimauchi H en condiciones de aislamiento absoluto. La muestra fue depositada en un vial con 1ml de RTF a 4°C y fue llevada al laboratorio para su procesamiento antes de dos horas. La identificación de *E. faecalis* se realizó mediante cultivo microbiológico clásico y biología molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**Resultados:** *E. faecalis* se identificó en el 63,33% (19 individuos) de las muestras microbiológicas obtenidas de dientes diagnosticados con PAA.

**Conclusión:** El alto porcentaje de aislamiento de *E. faecalis* en la población estudiada, confirma que este patógeno forma parte de la microbiota habitual en la PAA.

## 2. INTRODUCCIÓN

La literatura endodóntica ha establecido ampliamente que los microorganismos juegan un rol fundamental en el desarrollo y mantención de las patologías pulpares y periapicales [1].

En una necrosis pulpar total, los patógenos que colonizan el sistema de canales radiculares (SCR) son capaces de iniciar una respuesta inmunoinflamatoria por parte del hospedero en los tejidos periapicales, como la periodontitis apical, que se caracteriza por la reabsorción del hueso alveolar [2].

Las infecciones endodónticas se caracterizan por presentar una microbiota mixta, caracterizada por una gran variedad de combinaciones bacterianas [3-5].

En los últimos años, gracias al perfeccionamiento de nuevas técnicas moleculares de detección bacteriana, se han identificado algunas especies de la microbiota endodóntica que son fundamentales en el desarrollo de lesiones endodónticas primarias y persistentes, y que son muy difíciles de cultivar mediante microbiología clásica [3,6,7].

*Enterococcus faecalis* es el microorganismo mayormente aislado en las infecciones endodónticas persistentes [8,9]. Es probablemente el patógeno que mejor se adapta y tolera las condiciones ecológicas existentes en los conductos radiculares, gracias a ciertas características microbiológicas como sus factores de virulencia y su capacidad de formar biopelículas [10].

A raíz de la importancia endodóntica de *E.faecalis*, este trabajo de investigación tiene como propósito determinar la presencia de este patógeno en la Periodontitis Apical Asintomática, a fin de esclarecer su participación en el establecimiento de esta infección endodóntica primaria.

## 2.1. MARCO TEÓRICO

La Periodontitis Apical Asintomática (PAA) es la inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares causada por microorganismos y sus productos presentes dentro del sistema de canales radiculares de los dientes afectados [11].

Diversos autores señalan que las vías de invasión microbiana a los canales radiculares corresponden a pérdidas de tejido de la corona del diente como resultado de caries, procedimientos clínicos, traumatismos, microfisuras y fracturas. Sin embargo, la infección pulpar también se puede desencadenar gracias a la exposición de túbulos dentinarios en la porción cervical del diente debido a comunicaciones en la capa de cemento. Asimismo, los microorganismos también acceden al tejido pulpar a través de la circulación sanguínea (vía anacorética). Cualquiera sea la puerta de entrada del patógeno, se genera una inflamación y posterior necrosis del tejido [12,13].

La pulpa infectada y necrótica ofrece un hábitat selectivo para los microorganismos, ocasionando cambios inflamatorios o degenerativos a nivel de este tejido, a lo que se suma la respuesta inmunológica del hospedero que puede variar en magnitud y severidad. Esta respuesta inmune involucra a una serie de eventos celulares, vasculares y moleculares con el fin de detener el avance de los agentes patógenos. Sin embargo, cuando el sistema de defensa se enfrenta a un gran número de microorganismos con un alto poder de virulencia, persiste la infección, destruyendo la mayor parte de los tejidos y dando lugar a la PAA [13].

La gravedad de la destrucción en una lesión perirradicular depende del equilibrio entre los productos del microorganismo patógeno y la respuesta inmune del hospedero. Las repercusiones en el periodonto van desde el engrosamiento del ligamento periodontal y la reabsorción de la lámina dura, hasta la destrucción del hueso apical, dando como resultado la formación de un granuloma o quiste radicular periapical que es observable radiográficamente como un área radiolúcida

bien delimitada. La acumulación de mediadores inflamatorios es fundamental en la reabsorción ósea, la cual es una característica del desarrollo de la lesión periapical de la PAA [11,14].

Si bien, los hongos, las arqueas, y los virus contribuyen a la diversidad microbiana en las infecciones endodónticas, las bacterias son los microorganismos más prevalentes en estas infecciones [15].

Los dientes comparten el microambiente de la cavidad oral con alrededor de 700 especies bacterianas, considerándose a ésta como el nicho ecológico con mayor biodiversidad conocido hasta ahora [16].

La baja tensión de oxígeno presente en el sistema de canales radiculares (SCR) con necrosis pulpar, la escasa disponibilidad de nutrientes y las interacciones bacterianas son los factores ecológicos que ayudan a determinar la composición de la microbiota del canal radicular. Una interacción microbiana positiva, es decir, aquella que ayuda a los microorganismos a usar de forma óptima los recursos del ambiente, mejora la capacidad de supervivencia de las bacterias que interactúan, permitiendo que las diferentes especies coexistan en ambientes donde no podrían hacerlo por sí solas. Además éstas ayudan a desarrollar una mayor patogenicidad debido a los efectos sinérgicos entre las especies [17].

Las diversas técnicas utilizadas para el estudio de la microbiota pulpar y periapical evidenciaron que las bacterias observadas con mayor frecuencia en las infecciones endodónticas primarias son las anaerobias obligadas y facultativas. Dentro de los géneros frecuentemente aislados se incluyen: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Enterococci*, *Treponema*, *Peptostreptococci*, *Eubacterium*, *Actinomyces* y *Streptococci* [4,18,19].

### 2.1.1. *Enterococcus faecalis*

Entre las bacterias presentes en una infección endodóntica, la frecuencia y el papel de los *Enterococci* ha requerido de una considerable atención [8,20,21]. Los *Enterococci* han sido identificados como géneros con especies bacterianas resistentes a los antibióticos entre ellos la Vancomicina, antibiótico de uso restringido, lo que ha generado serias dificultades terapéuticas [22]. Alrededor de un 90% de las infecciones originadas por *Enterococci* en los seres humanos son causadas por *Enterococcus faecalis* [23].

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo coco Gram positivo que se encuentra formando parte de la microbiota de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal. Es un anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado que se dispone en pares o cadenas. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros [24-27].

Este microorganismo posee numerosos factores de virulencia, entre los más importantes se encuentran:

- **Sustancia de agregación:** facilita el contacto entre bacterias durante el intercambio de plásmidos. Además, potencia considerablemente la adherencia a tejidos del hospedero y la internalización del microorganismo en los macrófagos [26,28].
- **Adhesinas o proteínas de superficie:** Esp (Proteína de superficie de enterococos) y Ace (Adhesina para el colágeno), relacionadas con la formación de biopelículas y con la adherencia del microorganismo a las proteínas de la matriz extracelular y al colágeno tipo I y IV. La capacidad de esta bacteria de adherirse al colágeno ha sido demostrado, evidenciando que desempeña un papel en la patogenia de la endocarditis bacteriana [29].

- **Feromonas sexuales:** promueven la transferencia conjugativa de plásmidos entre las cepas, lo que se asocia principalmente con la transferencia de genes de resistencia antibiótica [28].
- **Ácido lipoteicoico:** estimulan a los leucocitos a liberar mediadores inflamatorios [28].
- **Superóxido extracelular:** radicales de oxígeno relacionados con el daño tisular y celular [28].
- **Gelatinasa:** hidroliza la gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina e inulina [28].
- **Hialuronidasa:** degrada el ácido hialurónico, lo que se asocia a un daño tisular en los tejidos blandos como consecuencia de su actividad. Además, aumenta la invasión bacteriana por la despolimerización de los mucopolisacáridos del tejido conectivo, los que utiliza como fuente de nutrientes [28,30].
- **Hemolisina:** produce la lisis total de los eritrocitos, además de destruir polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos [26].
- **Citolisina:** cambia las condiciones de tensión oxígeno, generando un ambiente anaerobio en los canales radiculares, lo que suprime el crecimiento de otras bacterias [28].

Gracias a la presencia de estos factores, *E. faecalis* es capaz de sobrevivir en medios con pocos o escasos nutrientes en un estado metabólico mínimo, llegando a soportar condiciones adversas por más de 4 meses. Esta bacteria en

estado de latencia, utiliza el fluido proveniente del hueso alveolar y el ligamento periodontal como fuente de nutrientes cuando se encuentra disponible [30].

*E. faecalis* es un microorganismo extremadamente difícil de erradicar mediante la irrigación, instrumentación e incluso mediante la medicación intracanal [26,29-31].

Este patógeno es capaz de formar un biofilm que le otorga una resistencia 1000 veces mayor a la fagocitosis y a la acción de anticuerpos y antimicrobianos si se compara con su estado planctónico, es decir, suspendido en un medio líquido y no adherido a ninguna superficie [32]. Además, resiste la acción de colorantes y de una amplia gama de antibióticos. Existen tres hipótesis que pueden explicar la resistencia de estas biopelículas a los antibióticos. La primera hipótesis se refiere a la reducción o baja penetración del medicamento a través de la misma; la segunda se basa en los posibles cambios en el medio ambiente químico de la biopelícula, y la tercera sugiere que las sub-poblaciones de bacterias dentro del biofilm adquieren una capacidad fenotípica diferente [26].

También se ha detectado un grado de tolerancia al Hipoclorito de Sodio al comienzo de la fase estacionaria de este microorganismo, presumiblemente como consecuencia de cambios en la composición de su membrana celular a causa de la privación [33]. Asimismo, el Digluconato de Clorhexidina al 2% muestra falencias a la hora de eliminar el patógeno, cuando se usa como irrigante [34].

Una característica notable de esta especie la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias, como lo son las zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de NaCl) y las temperaturas extremas (15°C-60°C), a pesar que la temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en

presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las especies son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas [22,26,35].

*E. faecalis* tolera un pH de hasta 11.5, razón por la cual este microorganismo sobrevive al tratamiento antimicrobiano con Hidróxido de Calcio, agente antimicrobiano con excelente acción bactericida que mantiene el pH en valores cercanos a 12, lo que le permite proliferar cuando la acción de éste finaliza. Esta resistencia se produce por su capacidad para regular el pH interno con una eficiente bomba de protones. Gracias a la generación de estos iones, la bacteria mantiene un pH bajo adecuado para mantener la homeostasis celular [36].

*Enterococcus faecalis* es un patógeno oportunista asociado con las infecciones orales, entre ellas periodontitis marginales, infecciones del canal radicular y lesiones perirradiculares. Se ha informado una correlación entre la prevalencia de este microorganismo en los canales radiculares de infecciones endodónticas primarias y secundarias y la presencia de este microorganismo en otros sitios de la cavidad oral, como en el surco gingival, la mucosa bucal, el dorso de lengua y las amígdalas en un mismo paciente, sugiriendo que la invasión de los canales radiculares por parte del microorganismo proviene de otros reservorios de la cavidad oral donde se encuentra en forma habitual [37].

*E.faecalis* tiene la habilidad de trasladarse desde el canal radicular de dientes infectados al sistema de ganglios linfáticos submandibulares de ratones libres de gérmenes, lo que sugiere que este microorganismo puede desempeñar un rol en la patogénesis de las infecciones oportunistas como bacteremia, endocarditis, y meningitis bacteriana, entre otras [38,39]. También se ha informado de importantes enfermedades sistémicas provocadas por la llegada de este patógeno al torrente sanguíneo a través de la terapia endodóntica, entre

ellas abscesos cerebrales y septicemias, particularmente graves en pacientes inmunocomprometidos [40,41].

### **2.1.2. *Enterococcus faecalis* y su relación con la PAA**

La Periodontitis Apical Asintomática se caracteriza por presentar una microbiota mixta. Generalmente, se pueden encontrar más de tres especies distintas de microorganismos dentro de un canal radicular con PAA [3-5]. *Enterococcus faecalis* ha sido identificado ocasionalmente en los canales radiculares de dientes con esta patología endodóntica [18].

En las lesiones endodónticas persistentes *Enterococcus faecalis* ha sido señalado como un microorganismo preponderante [4,42]. Este microorganismo es el patógeno más frecuente, y a veces el único aislado en la lesión endodóntica secundaria, lo que sugiere que esta especie por sí sola tiene el potencial de mantener la infección del SCR [28].

Para que este microorganismo pueda mantener una periodontitis apical y causar una enfermedad post-tratamiento, debe sobrevivir dentro de los canales radiculares ya obturados y poseer las propiedades patogénicas necesarias para perpetuar la inflamación externa del SCR. Además, debe ser capaz de tolerar las condiciones ecológicas existentes en los canales radiculares tratados endodónticamente. Este microorganismo se encuentra en las pulpas necróticas y sobrevive a los procedimientos quimiomecánicos debido a las limitaciones que éstos presentan por la compleja anatomía radicular, ya que este patógeno se aloja en túbulos dentinarios, ramificaciones, istmos y deltas apicales, situación que le es propicia a la hora de restablecer la infección endodóntica [26,27,43].

La presencia de este microorganismo en etapas iniciales de la infección, podría asociarse con posibles fracasos endodónticos, y subsecuentes

enfermedades sistémicas si éste no es eliminado en su totalidad durante la irrigación e instrumentación biomecánica [21].

*E.faecalis* es menos sensible a las terapias antimicrobianas, y gracias a esto persiste con mayor frecuencia en el SCR luego de los procedimientos endodónticos. Además, esta bacteria puede colonizar el interior de los canales radiculares o invadir la obturación de los mismos por filtración coronal luego de la terapia endodóntica [26,27].

*E. faecalis* se ha detectado en un rango entre 4% y 40% en canales radiculares de dientes con lesiones endodónticas primarias, y en un rango entre 24% y 77% en infecciones endodónticas secundarias en dientes con fracaso endodóntico [5,20,24,25,42,44-49].

Estudios actuales en el mundo demuestran la presencia de este microorganismo en los canales radiculares de dientes con diagnóstico de PAA en frecuencias variables: 3.3% [4], 8% [48], 11.5% [45], 25% [50], 32% [51], 33% [42], 60% [47], 82% [52], 89.3% [53] entre otros.

Investigaciones realizadas para detectar la presencia del patógeno en dientes con PAA en la población chilena, arrojan valores de 3.4% y 42.6% [54,55].

En la actualidad, existen diversos protocolos de irrigación que no son eficaces en la eliminación de *Enterococcus faecalis*, por lo que su detección temprana, necesariamente nos llevaría a evaluar los protocolos vigentes [34].

**El objetivo de este estudio es determinar la presencia de *E.faecalis* en dientes con diagnóstico de PAA.**

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

*Enterococcus faecalis* se aísla con frecuencia en lesiones endodónticas primarias en dientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática.

#### **3.2. OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia de *Enterococcus faecalis* en exudado canalicular de dientes con diagnóstico de PAA, mediante microbiología clásica y molecular.

#### **3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar fenotípicamente *Enterococcus faecalis* en muestras de pacientes con PAA.

Identificar molecularmente *Enterococcus faecalis* en muestras de pacientes con PAA.

Determinar la prevalencia de *E. faecalis* en canales radiculares de pacientes con PAA.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio Observacional de Cohorte.

### **4.2. GRUPO DE ESTUDIO**

Se seleccionaron 30 pacientes con dientes unirradiculares y diagnóstico clínico y radiográfico de PAA, que acudieron a tratamiento a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A cada participante del estudio se le entregó un consentimiento informado para su firma (Anexo 1), el cual fue leído y explicado previamente por los investigadores. El protocolo del estudio se encuentra adscrito al Proyecto FIOUCh n° 09-04 “Eficacia del Ozono e Hipoclorito de Sodio al 5.25% sobre la microbiota aislada con mayor frecuencia en Periodontitis Apical Crónica (PAC)”, y fue aprobado por los Comité de Ética y de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2 y 3 respectivamente).

Los criterios de inclusión fueron: pacientes adultos, sanos o con enfermedades sistémicas crónicas controladas, sin condición de embarazo, y sin consumo de antibióticos durante los últimos 3 meses. Se estudiaron pacientes con dientes unirradiculares, periodontalmente sanos, con posibilidad de aislamiento absoluto, con diagnóstico de PAA (necrosis total séptica e imagen radiográfica radiolúcida compatible con granuloma o quiste periapical), para lo cual se realizó anamnesis, examen radiográfico y test de sensibilidad pulpar (frío probado con cloruro de etilo y calor con trans-poliisopreno), con una respuesta a la percusión normal o levemente aumentada. En la respectiva ficha clínica, se registraron las características generales y clínicas de cada paciente como edad, sexo y estado coronario (Anexo 4).

### 4.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

El procedimiento fue realizado bajo estricta asepsia.

Se limpió la corona con piedra pómez y escobillas estériles, removiendo caries y obturaciones defectuosas del diente a tratar. Luego se aplicó anestésico local tópico y punción anestésica infiltrativa local con el fin de facilitar la colocación del clamp en el protocolo de aislamiento absoluto. Una vez colocado el aislamiento absoluto, se procedió a la desinfección de la goma dique con NaOCl al 5.25 % por 1 minuto e inactivación con Tiosulfato de Na al 5%, para posteriormente enjuagar con solución salina estéril.

La cavidad de acceso endodóntico se realizó con piedras de diamante de alta velocidad en esmalte dentario, refrigerando con solución salina isotónica estéril. En dentina se cortó con fresas de carburo-tungsteno redondas estériles. Finalizada la cavidad de acceso, se procedió nuevamente a realizar la desinfección de la goma dique, luego se retiró el contenido necrótico coronario pulpar, de existir, con cuchareta de caries estéril. La longitud aparente del canal se determinó en la radiografía inicial, y se estableció la permeabilidad del canal con limas K finas, irrigando con solución fisiológica estéril (Figura 1).



Figura 1. Aislación de campo operatorio y permeabilización del canal.

Las muestras fueron tomadas con conos de papel estériles mantenidos durante 60 segundos al interior del canal a fin de obtener el fluido radicular. Se utilizaron 3 puntas de papel estériles en forma seriada lo más profundo que se pudieron introducir según el calibre del canal (Figura 2).



Figura 2. Obtención de la muestra mediante puntas de papel estéril.

Los conos fueron depositados en un vial conteniendo 1 ml de medio de transporte RTF a 4°C, para luego ser procesados en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para el estudio microbiológico clásico y molecular de *E. faecalis* del SCR (Figura 3).

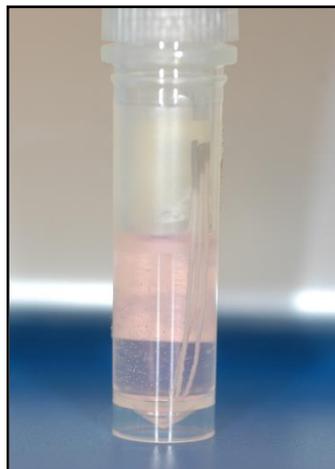


Figura 3. Vial conteniendo los conos en 1 ml de medio de transporte RTF.

## 4.4. PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO

### 4.4.1. Cultivo microbiológico e identificación

A partir de la muestra en RTF, se efectuaron diluciones seriadas en base 10 en Buffer Fosfato de Sodio, pH 7.4. De la dilución  $1 \times 10^{-3}$  fueron sembrados 100  $\mu$ l en placas de agar sangre de cordero no selectivo para la detección de *Enterococcus faecalis*. Las placas se incubaron a 35 ° C por 48 horas en una jarra con vela.

Luego del período de cultivo, se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica para identificar las colonias de *E. faecalis*.

La pureza de los cultivos fue confirmada por tinción de Gram y observación de la morfología de las colonias en agar sangre.

Se realizó una identificación rápida mediante la producción de catalasa, las colonias catalasa negativa fueron sembradas en agar bilis esculina para observar la hidrólisis de ésta. En el medio de cultivo agar bilis esculina, la esculina liberada se combina con los iones férricos del medio para formar un complejo de color negro, que evidencia la reacción positiva de la hidrólisis ante la presencia del microorganismo [56].

## 4.5. PROCESAMIENTO MOLECULAR

### 4.5.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el método de lisis celular por medio de ebullición [57].

Las muestras en RTF fueron homogeneizadas en un vortex por 5 minutos.

Se extrajeron 200µl de suspensión de cada muestra, la que fue traspasada a tubos estériles libres de DNAsas y RNAsas.

Los tubos contenedores de la suspensión se colocaron en un termoblock marca Thomas Scientific® a 112°C por un tiempo de 8 minutos.

Luego se mantuvieron a una temperatura de -20°C por 10 minutos.

Se centrifugaron a 13500 rpm por 5 minutos en una centrífuga Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH®, modelo 5417R.

El sobrenadante fue retirado y situado en un tubo eppendorf estéril y libre de DNAsas y RNAsas, para la posterior amplificación mediante PCR [46].

### 4.5.2. Técnica de PCR (Polymerase chain reaction)

Para la identificación molecular se utilizó la técnica de PCR, usando 2 partidores específicos, que se ubican en la posición 165-187 y 457-474 (reverso) del genoma de *E faecalis*. Estos 2 cebadores amplifican un fragmento de

aproximadamente 310 pares de bases (bp), el que es utilizado para la identificación de *E. faecalis* [46]. El sitio de amplificación usado fue el ARNr 16S por su gran conservación dentro de las especies. Éste es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 unidades, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener importante información filogenética y taxonómica [58].

La reacción de PCR se realizó en 25 µl de mezcla que contiene 2.5 µl de Buffer 10x NH<sub>4</sub> (Bioline®), 1 µl 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline®), 0.2 µl de Taq DNA polimerasa 5 UI/L (Bioline®), 0.5 µl 10 mM/µl de dNTP (Bioline®), 14.8 µl de agua nanopura, 1 µl del partidor específico 50 mM/µL (*E. faecalis* F – GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG, *E. faecalis* R – CCG TCA GGG GAC GTT CAG), y 5 µl del ADN de la muestra.

Para el control positivo se utilizó una muestra de DNA de *E. faecalis* (ATCC 29212) de 310 bp y como control negativo se utilizó agua nanopura en reemplazo de la muestra de ADN.

Posteriormente, los tubos contenedores de la mezcla se llevaron a un termociclador marca Axygen®, modelo Maxygene Gradient, para la amplificación del DNA.

La amplificación se realizó con un período de desnaturalización a 95°C por 2 min, 36 ciclos de amplificación (95°C 30s, 60°C 1min, 72° 1 min), y un período final de 72°C por 2 min [46].

### 4.5.3. Electroforesis

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis.

Se tomaron 4  $\mu$ l de los productos de la PCR de cada muestra, a los que se le adicionaron 2  $\mu$ l de Loading Buffer Blue GDLX 5x Bioline®, y se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE con gel Red®. En el primer carril se depositaron 5 $\mu$ l del marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder Favorgen®.

En una cámara de electroforesis horizontal marca Labnet® USA, modelo Enduro, se corrió la electroforesis por 2 horas a 55 volts.

Los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta de 300 nm en un trasiluminador Dyna Light, Labnet®.

La identidad de cada grupo se determinó mediante la comparación visual con una escala de tamaño molecular. Las reacciones se consideraron positivas ante la detección de bandas del correspondiente tamaño molecular [51].

## 5. RESULTADOS

Tabla 1. Frecuencia de distribución de *Enterococcus faecalis* según sexo y edad.

Grupos de edades	Masculino		Femenino		Total de Ef positivo
	Ef +	Ef -	Ef+	Ef -	
15-24 años	3.33%	0 %	3.33%	0 %	6.67%
25-34 años	3.33%	0 %	0 %	3.33%	3.33%
35-44 años	6.67%	10.00%	3.33%	0 %	10.00%
45-54 años	3.33%	6.67%	10.00%	10.00%	13.33%
55-64 años	10.00%	6.67%	6.67%	0 %	16.67%
65-74 años	6.67%	0 %	3.33%	0 %	10.00%
75 y más años	0 %	0 %	3.33%	0 %	3.33%
<b>Total</b>	<b>33.33%</b> <b>(n= 10)</b>	<b>20%</b> <b>(n=7)</b>	<b>30%</b> <b>(n=9)</b>	<b>13.3%</b> <b>(n=4)</b>	<b>63.33%</b> <b>(n= 19)</b>

Tabla 1: Del total de la muestra, 10 pacientes del género masculino y 9 del femenino, fueron positivos para *E. faecalis* (Ef).

### 5.1. Identificación de *E. faecalis* mediante Microbiología clásica

La observación de la morfología de las colonias bajo lupa estereoscópica evidenció el desarrollo de colonias a las 48 horas de cultivo en Agar sangre en 15 pacientes. Al análisis macroscópico las colonias se visualizaron café-grisáceas, redondas, con un tamaño que oscilaba entre 1 y 2 milímetros de diámetro, ligeramente elevadas, de aspecto cremoso y de borde continuo (Figura 4), las cuales resultaron ser cocos Gram positivos frente a la tinción de Gram. Además estas colonias fueron negativas a la prueba de la catalasa (Figura 5).



Figura 4. Desarrollo de colonias de *E.faecalis* en Agar sangre corriente.

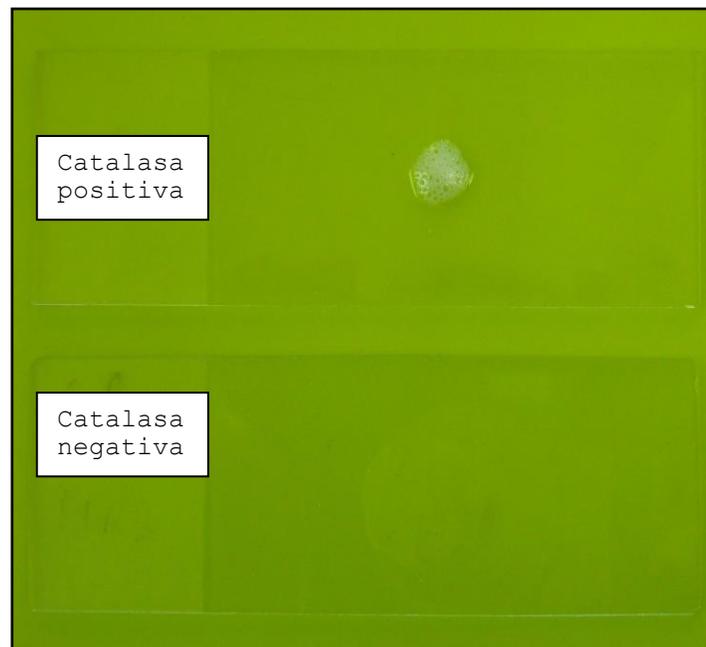


Figura 5. Prueba de la catalasa. Catalasa (+): se observa efervescencia. Catalasa (-): no se observa producción de burbujas a partir de las colonias depositadas en el portaobjeto.

Posteriormente, las colonias de las 15 muestras resembradas en Agar bilis esculina mostraron un ennegrecimiento del medio a las 48 horas de cultivo (Figura 6)

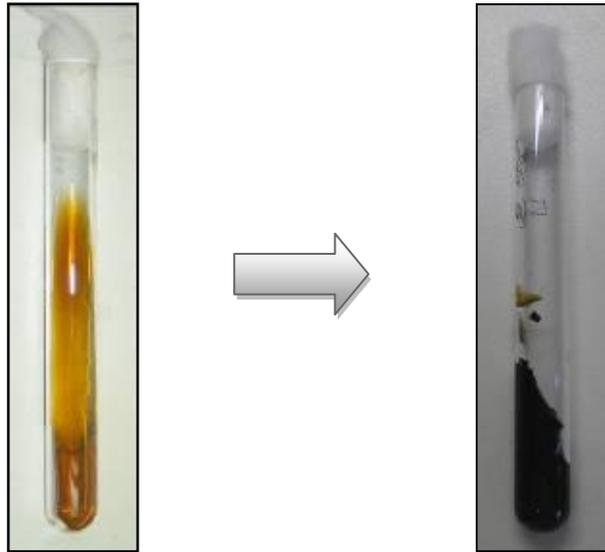
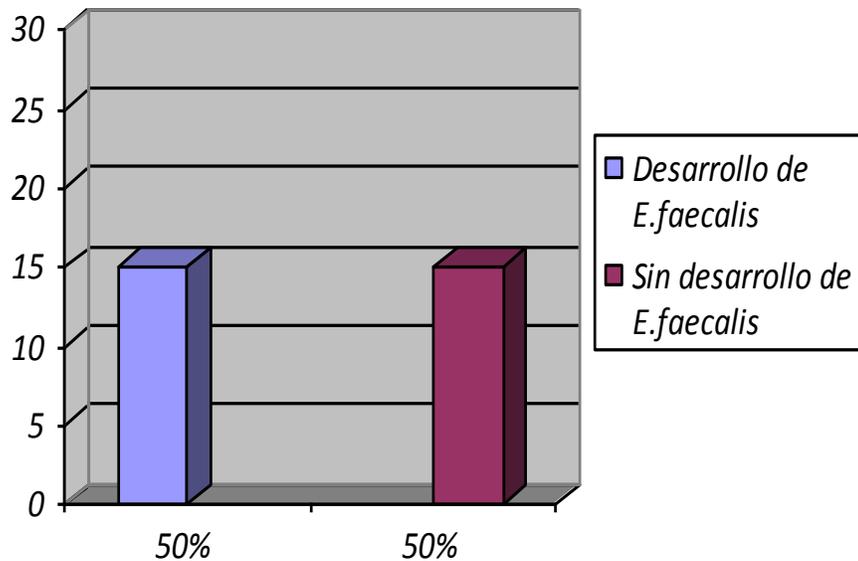


Figura 6. Hidrólisis positiva de la esculina, el medio varía de un color amarillo transparente a marrón-negro ante la presencia de *E. faecalis*.

A partir de nuestros resultados en base a microbiología clásica, se determina el desarrollo de *E. faecalis* en 15 de las 30 muestras participantes en el estudio.

Gráfico 1. Identificación por Microbiología clásica de *E. faecalis*



## 5. 2. Identificación de *E.faecalis* mediante Biología Molecular (PCR)

Luego del análisis molecular, se logró identificar la presencia de *Enterococcus faecalis* en 19 muestras del total del grupo estudio.

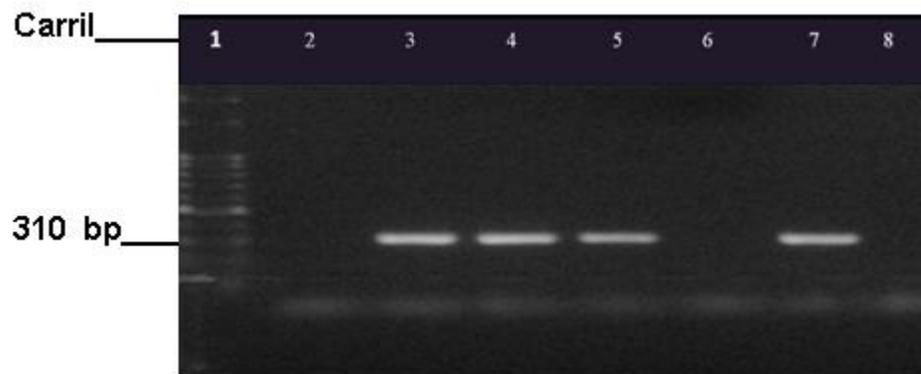


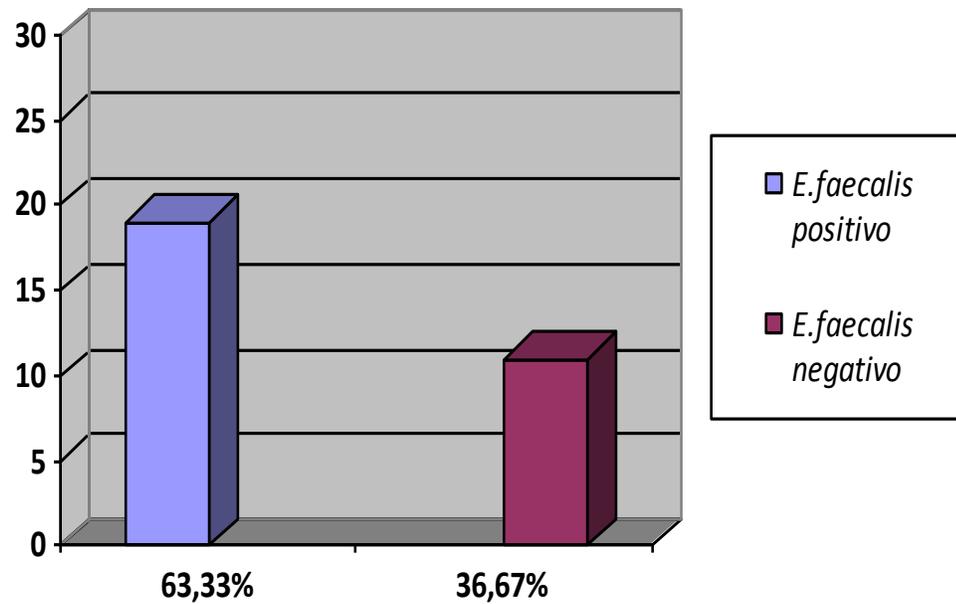
Figura 7. Electroforesis de los productos de amplificación de *E.faecalis*.

Carril 1: marcador de peso molecular (100bp).

Carril 2-6: muestras clínicas.

Cjarril 7: Control (+) *E. faecalis*. ATCC 29212. Amplicon de *E.faecalis* 310 bp.

Carril 8: control (-).

Gráfico 2. Identificación molecular de *E. faecalis*Tabla 2. Resultados de la detección de *E. faecalis* mediante PCR y microbiología clásica.

	<i>E. faecalis</i> (+)	<i>E. faecalis</i> (-)	n	%
<b>Biología molecular(PCR)</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>30</b>	<b>63.33</b>
<b>Microbiología clásica</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>50</b>

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *E.faecalis* en dientes con diagnóstico de PAA, ya que si bien, se conoce ampliamente que este patógeno es el principal agente involucrado en fracasos endodónticos, no está bien determinado aún el rol que juega en infecciones endodónticas primarias como la PAA.

En nuestro país son escasas las investigaciones que se han realizado respecto a infecciones endodónticas primarias y la información al respecto, proviene fundamentalmente de trabajos realizados y publicados en el extranjero.

Los resultados de esta investigación arrojaron que *E. faecalis* se detectó en una alta proporción del grupo de pacientes que presentaban dientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática, esto es, en el 63.33%. Lo que confirma nuestra hipótesis de trabajo, ya que se evidenció una alta presencia del microorganismo en esta patología endodóntica.

El 63.33% obtenido se enmarca dentro del amplio rango de valores que describen las publicaciones provenientes del resto del mundo con respecto a la presencia del patógeno (3.3%-89.3%). Sin embargo, al compararlo con los datos obtenidos en Chile, nuestro resultado supera a los estudios hasta ahora conocidos, 3.4% y 42.6% [54,55]. Esta discrepancia en los porcentajes se puede atribuir al tamaño de la muestra, a la localización geográfica del grupo en estudio (que hace variar la composición de la microbiota del SCR) y a las diferentes técnicas de identificación bacteriana utilizadas. *E. faecalis* se ha detectado en porcentajes más altos en PAA (67%-77%) cuando es utilizado un método molecular [42,59,60]. Entre ellas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se destaca por presentar un

diagnóstico de elevada exactitud en comparación con los procedimientos de cultivo convencionales. Se ha descrito que la técnica PCR es capaz de amplificar secuencias génicas más de 10 millones de veces y tiene un nivel de detección potencial de 10 células bacterianas. La PCR tiene una sensibilidad mayor que cualquier técnica microbiológica de cultivo en la detección de bacterias dado que el método no es dependiente de la proliferación de microorganismos, detectando solamente la presencia de secuencias específicas de ADN en las muestras biológicas. Por otra parte, la secuenciación del ARNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, y realiza una identificación taxonómica del patógeno en forma precisa [58,61]. A pesar de la alta capacidad de detección de los métodos moleculares mostrada en este estudio, se requiere de la combinación de técnicas moleculares y de cultivo tradicional para un entendimiento completo del papel de *E. faecalis* en el proceso infeccioso del SCR [21].

La frecuencia encontrada de *E. faecalis* en la muestra en estudio (63.33%) evidencia la presencia habitual de este patógeno en los canales radiculares de la población con PAA.

Se ha detectado *E. faecalis* en el 60% de muestras procedentes de escolares con alta actividad de caries y en el 75% de pacientes con infecciones endodónticas [62], lo que aparentemente vincula la presencia de este patógeno con el estado de salud oral. Además, se ha reportado la presencia del microorganismo en el 29% de muestras de saliva, en el 55% de dorso de lengua y en el 22% de muestras de surcos gingivales de pacientes con infecciones endodónticas [62]. Otros estudios han detectado *E. faecalis* con una frecuencia significativamente mayor en muestras de saliva y subgingivales de pacientes con periodontitis, con valores de 40.5% y 47.8% respectivamente [63].

La presencia de este microorganismo en el canal radicular de los dientes afectados en el grupo en estudio, sugiere revisar los protocolos de irrigación para la eliminación de *E. faecalis*, ya que según las características de este patógeno, se hace muy difícil de erradicar del sistema de canales radiculares con protocolos de irrigación convencionales. Asimismo, se vuelve perentoria la búsqueda de sustancias químicas, medicaciones intracanal y antibióticoterapias a los que este patógeno sea susceptible. De esta forma, se podría contribuir al éxito de la terapia endodóntica y a la reducción de los fracasos, en los cuales este microorganismo se aísla preponderantemente. Por otra parte, la temprana y completa desinfección del canal radicular contribuye a mejorar la salud sistémica del individuo al disminuir el riesgo de infecciones oportunistas ocasionadas por este patógeno, como bacteremias, endocarditis y meningitis bacterianas, entre otras, ya que existe evidencia de la migración de *E. faecalis* desde canales radiculares infectados hacia la cadena de ganglios linfáticos submandibulares [38,39].

## **7. CONCLUSIÓN**

El alto porcentaje de aislamiento de *E. faecalis* en la población estudiada, confirma que este patógeno forma parte de la microbiota habitual en la PAA.

## **8. SUGERENCIA**

Se considera necesario el estudio a cabalidad de *Enterococcus faecalis* en la población chilena, a fin de mantener controlada la capacidad infectiva de este microorganismo. Además, es imperiosa la búsqueda de sustancias químicas y medicaciones intracanal a los que esta bacteria sea susceptible, con el objetivo de desarrollar protocolos de irrigación eficaces contra este patógeno para lograr una óptima desinfección intracanal.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kettering J, Torabinejad M. (1999). Microbiología e Inmunología. En: Cohen S, Burns R, Vías de la Pulpa. Séptima edición. Ed. Harcourt. Madrid. pp. 439-445.
- [2] Love R, Jenkinson H. (2002). Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13(2):171-183.
- [3] Siqueira J, Rôças I. (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2- Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 31:488-498.
- [4] Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. (2004). Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 19(2):71-76.
- [5] Pinheiro E, Gomes F, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Souza-Filho F. (2003). Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 36(1):1-11.
- [6] Siqueira J, Rôças I. (2005). Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1-Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *J Endod.* 31: 411-423
- [7] Fouad A, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R. et al. (2002). PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *J Clin Microbiol.* 40: 3223-3231.

- [8] Sundqvist G, Fidgor D, Sjögren U. (1998). Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 85(1):86-93.
- [9] Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Souza Filho F. (2003). Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 18: 100-103.
- [10] Díaz A. (2008). Aspectos relevantes de *Enterococcus faecalis* y su participación en las infecciones de origen endodóntico. *Carlos Bóveda Z.vFebrero* (55).
- [11] Torabinejad M, Walton RE. (2002). Periradicular lesions. In: Ingle JI, Bakland LK, editors. *Endodontics.* 5th ed. London: BC Decker Inc.175-201.
- [12] Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K-S, Xia T. (1999). Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 25(6):413-415.
- [13] Nair PN. (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(6):348-381.
- [14] Stashenko P, Teles R, D'Souza R. (1998). Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9(4):498–521.
- [15] Siqueira JF Jr, Rôças IN. (2009). Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 88(11):969-981.
- [16] Perea EJ. (2004). La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Oral Patol Oral Cir Bucal.* 9:1-10.

- [17] Rôças IN., Siqueira JF Jr. (2008). Root canal microbiota of teeth with Chronic Apical Periodontitis. *J of Clin Microbiol.* 46(11): 3599-606.
- [18] Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. (2002). Actinomyces species, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endodod.* 28(3):168-172.
- [19] Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 20(4):211-215.
- [20] Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. (1998). Microbiological status of root-filled teeth with Apical Periodontitis. *Int Endod J.* 31(1):1-7.
- [21] Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia A, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. (2006). *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 102(2):247-253.
- [22] Hunt CP. (1998). The emergence of *Enterococci* as a cause of nosocomial infection. *Br J Biomed Sci.* 55(2):149–156.
- [23] Jett B, Huycke M, Gilmore M. (1994). Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 7(4):462-478.
- [24] Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. (2000). Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 26:593-595.

- [25] Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moisewitsch J. (2001). Bacteria isolated after unsuccessful treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 91:579-586.
- [26] Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. (2003). *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and 'star' in post treatment disease. *Endod Topics.* 6:135-159.
- [27] Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 32(2):93-98.
- [28] Kayaoglu G., Ørstavik D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease, *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(5):308-320.
- [29] Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. (2003). Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 18(2):121-126.
- [30] Fidgor, J.K.Davies, G.Sundqvist. (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology.* 18(4):234-239.
- [31] Toledo-Arena A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M et al. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 67(10):4538-4545.
- [32] Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 28(10):689-693.

- [33] Laplace J, Thuault M, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. (1997). Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Current Microbiology* 34(5): 284–289.
- [34] Estrela C, Ammeida J, Goncalves A, Rodríguez C, Almeida D. (2008). Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 16(6):364-368.
- [35] Leclercq R. (1997). *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis.* 24(Suppl 1):S80–S84.
- [36] Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 35(3):221–228.
- [37] Liébana Ureña J. *Microbiología Oral.* (2002). 2°ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- [38] Ribeiro Sobrinho AP, Barros MHM, Nicoli JR. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J Endod.* 24(6):405– 408.
- [39] De Melo Maltos SM, Ribeiro Sobrinho AP, Silva FV, et al. (2003). Bacterial concentrations determine the ability to implant in the root canal system and translocate to lymph nodes in germ-free mice. *J Endod.* 29(1):24–27.
- [40] Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. (1994). Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endod Dent Traumatol.* 10(2):57-65.

- [41] Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. (1995). Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 11(3):142-149.
- [42] Rôças IN, Siqueira JF, Santos KNR. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular disease. *J Endod*. 30(5):315-320.
- [43] Siqueira JF Jr. (2001). A etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 34(1):1-10.
- [44] Sundqvist G, Figdor D. (1998). Endodontic treatment of Apical Periodontitis. In: Orstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential Endodontology*. Oxford, UK: Blackwell, 242–277.
- [45] Siqueira J. (2002). Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 94(3):281-293.
- [46] Siqueira JF Jr, Rôças IN. (2004). Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 97(1):85–94.
- [47] Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. (2005). Detection of bacteria in endodontic samples by Polymerase Chain Reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*. 20(5):289–295.
- [48] Fouad AF, Zerella J, Barry J, Sapangberg LS. (2005). Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 99(1):112–118.

- [49] Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. (2008). Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiol.* 31(2):235-240.
- [50] Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan A. (2009). Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci.* 17(5):370-374.
- [51] Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy SC, Eronat C. (2007). Detection of *Enterococcus faecalis* in necrotic teeth root canals by culture and Polymerase Chain Reaction methods. *Eur J Dent.* 1(4):216–221.
- [52] Siqueira JF Jr, Alves F, Rôças IN. (2011). Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod.* 37(11):1499-1503.
- [53] Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. (2007). Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 22(6):390-397.
- [54] Arévalo N, Antúnez M, Gallardo A. (2003). Relación entre PCR positivo para *Enterococcus spp* y dientes trepanadas con diagnóstico de Periodontitis Apical Crónica. Trabajo de investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.
- [55] Monardes H, Padilla C. (2009). Presencia de *Enterococcus faecalis* en canales radiculares infectados y su susceptibilidad frente a irrigantes y medicamentos de uso endodóntico. Tesis para optar al grado académico de Magister en Ciencias Biomédicas mención Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Talca.

- [56] Rodríguez E. (2005). Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 253.
- [57] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 11(4):266-273.
- [58] Rodicio MR, Mendoza MC. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(4):238-245.
- [59] Machado de OJC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, Rosado AS. (2007). Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 22(1):14–18.
- [60] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SS, Rosado AS. (2008). Profiling of root canal bacterial communities associated with Chronic Apical Periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod.* 34(12):1457–1461.
- [61] Zambon JJ, Haraszthy VI. (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000. 7:69–82.
- [62] Gold OG, Jordan HV, van Houte J. (1975). The prevalence of *enterococci* in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol.* 20(7):473–477.
- [63] Sedgley C, Buck G, Appelbe O. (2006). Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 32(2):104-109.

## 10.1. ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE CHILE  
 FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
 DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este formulario de Consentimiento informado se aplicará a pacientes que tengan dientes afectados por periodontitis apical crónica, que acuden a realizarse un primer tratamiento endodóntico y lo podrá aplicar cualquiera de los miembros del equipo de investigación.

**Investigador Responsable:** Silvana Maggiolo Villalobos, Rut 9032986-3. Fono 2206994 - 9781839, Sergio Livingstone Paulhammer (Ex-Olivos) 943 comuna de Independencia Santiago. Email: [silmagg@yahoo.com](mailto:silmagg@yahoo.com)

### Antecedentes Generales

Las lesiones periapicales (periodontitis apical crónica) se producen generalmente como consecuencia de caries dentales. El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones de esta patología. Par evitar la persistencia de la lesión apical, durante la realización de la endodoncia se debe obtener, sino la esterilización del canal radicular, la mayor desinfección del mismo. La presente investigación tiene como objetivo comparar 2 sistemas de desinfección del canal, uno con el método convencional usando como irrigante NaOCl 5.25% y otro desinfectando el canal con un nuevo sistema que usa Ozono. Las ventajas de desinfectar el canal con Ozono es que este no altera las propiedades biológicas ni mecánicas de la estructura del diente lo que facilita su posterior rehabilitación con sistemas adhesivos estéticos.

### Procedimiento

Se incluirán sujetos entre 18 y 70 años, que en el examen clínico y radiográfico presenten diagnóstico de Periodontitis Apical Crónica. Cuando esté indicado, serán sometidos a tratamiento endodóntico, durante el cual se les tomará una muestra microbiológica desde el canal radicular afectado antes y después de la desinfección del canal. El total de muestras y datos obtenidos serán almacenadas por el investigador responsable para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

### Ventajas

Como ventajas de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les realizará en forma gratuita el tratamiento de endodoncia con sus respectivos controles clínicos y radiográficos a los 3, 6 y 9 meses.

### Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y que el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación.

<b>Identificación Paciente:</b>	<b>Identificación Dentista:</b>
Nombre.....	Nombre.....
RUT.....	RUT.....
Teléfono.....	Firma.....
Firma.....	

.....  
**Dra Silvana Maggiolo**  
**Investigador Responsable del Proyecto**

## 10.2. ANEXO 2



### ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

---

31/05/2010

ACTA N°: 2010/13

1. Acta De Aprobación Del Protocolo De Estudio Clínico N° 2010/06, Enmienda del 20/04/2010
2. Miembros del Comité Etico-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

**Prof. María Angélica Torres V. (DDS, PhD)**

Presidente CEC, Profesor Área Histología General, Dpto de Patología y Clínica Odontológica del Adulto, Fac. Odontología, U de Chile. Colaborador y Ex alumno del CIEB

**Prof. Blanca Urzua O. (PhD)**

Miembro permanente del CEC; Directora de Investigación Fac. de Odontología. Profesora Área Bioquímica, Dpto. de Ciencias Físicas y Qmcas., Fac Odontología. U. de Chile

**Prof. Jorge Gamonal A. (DDS, PhD)**

Miembro permanente del CEC; Director del Departamento de Odontología Conservadora. Fac Odontología. U de Chile

**Prof. Juan Cortes A (DDS)**

Secretario del CEC; Director del Departamento de Cirugía y Traumatología Bucal y Maxilofacial . Fac de Odontología, U de Chile

3. **Fecha d Aprobación:** 31/05/2010
4. **Titulo completo del proyecto:** "Eficacia del Ozono e Hipoclorito de sodio al 5,25% sobre microbiota aislada con mayor frecuencia en Periodontitis Apical Crónica (PAC)". Versión del 20/04/2010
5. **Investigador responsable:** Dra. Silvana Maggiolo V. Área de Endodoncia, Dpto. de Odontología Conservadora, Fac. Odontología. U. de Chile.
6. **Institución:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
7. **Documentación Revisada:**
  - Proyecto versión del 20/04/2010
  - Consentimiento Informado (CI) versión 27/05/2010
  - Currículo del investigador responsable
  - Nómina de coinvestigadores de la investigación.

#### 8. Carácter del estudio y la población:

Se trata de un ensayo clínico de terapia controlado en adultos.

#### 9. Fundamentación de la aprobación

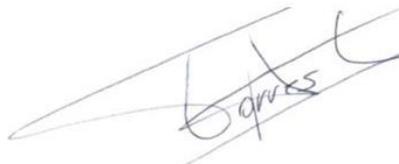
Este estudio propone evaluar la ventaja en eliminación bacteriana del conducto radicular de una nueva terapia de irrigación endodóntica mediante Ozono comparando con la terapia estándar que es el hipoclorito de Sodio al 5.24%. La desinfección del canal con el Ozono tiene la ventaja de no alterar las propiedades biológicas ni mecánicas de la estructura del diente, lo que facilita su posterior rehabilitación, siendo de gran utilidad para la sociedad.

Los riesgos de esta nueva terapia son mínimos comparados con la terapia convencional, de acuerdo a lo planteado por el investigador principal y a los antecedentes de la literatura presentados. La protección y confidencialidad de los datos de los participantes está debidamente asegurada.

En caso de reacciones adversas graves se deberá informar al comité de bioética dentro de las 48 hrs. Sigüientes, y una vez finalizado el estudio el comité deberá ser informado de los resultados del mismo.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, APRUEBA el estudio "Eficacia del Ozono e Hipoclorito de sodio al 5,25% sobre microbiota aislada con mayor frecuencia en Periodontitis Apical Crónica (PAC)". Versión del 20/04/2010 y El CI versión del 27/05/2010, y solicita que la fecha de edición sea dicho documento de CI.

Dicho estudio se llevará a cabo en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, bajo la responsabilidad de la Dra. Silvana Maggiolo V. Área de Endodoncia, Dpto. de Odontología Conservadora, Fac. Odontología. U. de Chile.



**Prof. María Angélica Torres V.**

Presidente CEC-FOUCH

C/C. Investigador Principal  
Secretaría C.E.C.

**10.3. ANEXO 3**

**Universidad de Chile**  
**Facultad de Odontología**  
**Comité Institucional de Bioseguridad (CIB)**

**C E R T I F I C A D O**

Las abajo firmantes certifican que el Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha aprobado las normas de bioseguridad del Proyecto de Investigación interno titulado **“Eficacia del Ozono e Hipoclorito de Sodio al 5,25% sobre la microbiota aislada con mayor frecuencia en periodontitis apical crónica (PAC)”**, del cual la Dra. Silvana Maggiolo Villalobos es la Investigadora Responsable, comprometiéndose a velar por el cumplimiento de ellas, durante el desarrollo de este proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Maggiolo, para los fines que estime convenientes.

*Maria Eugenia Franco*  
**PROF. TM. Maria Eugenia Franco**  
 Secretaria



*Carla de Salvo*  
**PROF. E.U. Darinka Medić Salvo**  
 Presidenta



Santiago, enero 18 de 2010.-

10.4. ANEXO 4



FICHA CLÍNICA ENDODONCIA

Diente a tratar  Referido por \_\_\_\_\_ N° comprobante de pago

\_\_\_\_\_ Edad  Sexo F  M

APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRES

Domicilio \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Alumno \_\_\_\_\_

Docente \_\_\_\_\_

<p><b>ANAMNESIS</b></p> <p>Enfermedades Generales _____</p> <p>Reacciones alérgicas frente a determinados fármacos _____</p> <p>Historia anterior del Diente _____</p>	<p><b>SINTOMATOLOGÍA ACTUAL</b></p> <p><input type="checkbox"/> Dolor <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Frio <input type="checkbox"/> Moderado</p> <p><input type="checkbox"/> Espontáneo <input type="checkbox"/> Esporádico <input type="checkbox"/> Constante <input type="checkbox"/> Calor <input type="checkbox"/> Severo</p> <p><input type="checkbox"/> Provocado <input type="checkbox"/> Posición decúbito <input type="checkbox"/> Localizado</p> <p><input type="checkbox"/> Sensación de diente elongado <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Irrradiado</p> <p><input type="checkbox"/> Masticación <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Fugaz</p> <p><input type="checkbox"/> Persistente</p> <p>Duración _____</p>
--	--

**EXÁMEN CLÍNICO EXTRAORAL**

Aumento del volúmen  Adenopatía  Fístula  Nada especial  Otros (especifique) \_\_\_\_\_

<p><b>EXÁMEN CLÍNICO INTRAORAL (Síntomas Objetivos)</b></p> <p><input type="checkbox"/> Cambio de color coronario</p> <p><input type="checkbox"/> Caries <input type="checkbox"/> super. <input type="checkbox"/> prof. <input type="checkbox"/> penetr.</p> <p><input type="checkbox"/> Cavidad <input type="checkbox"/> super. <input type="checkbox"/> prof. <input type="checkbox"/> penetr.</p> <p><input type="checkbox"/> Obturación <input type="checkbox"/> super. <input type="checkbox"/> prof. <input type="checkbox"/> penetr.</p> <p><input type="checkbox"/> Fractura <input type="checkbox"/> super. <input type="checkbox"/> prof. <input type="checkbox"/> penetr.</p> <p><input type="checkbox"/> Movilidad (grado) _____</p> <p><input type="checkbox"/> Saco periodontal (profundidad) _____</p> <p><input type="checkbox"/> Oclusión del diente <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Inoclusión <input type="checkbox"/> Trauma oclusal</p> <p>Malposición o versión _____</p>	<p><b>REGIÓN VESTIBULAR (en relación al diente)</b></p> <p><input type="checkbox"/> Cambio de coloración</p> <p><input type="checkbox"/> Dolor a la palpación</p> <p><input type="checkbox"/> Aumento de volúmen <input type="checkbox"/> Localizado <input type="checkbox"/> Difuso <input type="checkbox"/> Duro <input type="checkbox"/> Blando</p> <p><input type="checkbox"/> Fístula <input type="checkbox"/> Activa <input type="checkbox"/> Inactiva</p>	<p><b>EXÁMEN RADIOLÓGICO</b></p> <p><b>Reabsorción ósea marginal</b></p> <p><input type="checkbox"/> Vertical <input type="checkbox"/> Horizontal</p> <p><input type="checkbox"/> Discreta <input type="checkbox"/> Marcada <input type="checkbox"/> Franca</p> <p><b>Conductos Radiculares (claves)</b></p> <p>Único Vestibular (V) Palatino (P) Mesial (M) Distal (D)</p> <p>Mesio vestibular (mayor) (Mv1) Mesio vestibular (menor) (Mv2) Disto vestibular (DV) Mesio lingual (ML) Disto lingual (DL)</p> <p>Otro _____</p> <p>Claves conductos radiculares _____</p> <p><b>Cámara Pulpar</b></p> <p><input type="checkbox"/> Nada Especial <input type="checkbox"/> Amplia <input type="checkbox"/> Parcialm. Calcif. <input type="checkbox"/> Totalm. Cacif. <input type="checkbox"/> Obturada <input type="checkbox"/> Reabsorción Int. <input type="checkbox"/> No Observ.</p> <p>a) Normal b) Amplio c) Estrecho d) Curvo e) Bifurcado f) Reabsorción interna g) No visible h) Obturado</p>
--	--	---

<p><b>TESTS</b></p> <p>Frío (F) <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Disminuído <input type="checkbox"/> No responde</p> <p>Calor (C) <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Disminuído <input type="checkbox"/> No responde</p> <p>Corte dentinario <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Disminuído <input type="checkbox"/> No responde</p> <p>Percusión <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentado</p> <p>Exploración <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Disminuído <input type="checkbox"/> No responde</p> <p>Eléctrico (E) _____ D. Control (N° _____ ) _____</p> <p>Vitalómetro empleado: _____</p> <p><b>Tipo de Respuesta</b></p> <p>F <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa</p> <p>C <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa</p> <p>E <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa</p>	<p><b>RESPUESTA: (dolor)</b></p>	<p><b>Área Radiolúcida</b></p> <p><input type="checkbox"/> Límites <input type="checkbox"/> Difusos <input type="checkbox"/> Corticalizados</p> <p><input type="checkbox"/> Netos</p> <p><b>Área Radiolúcida</b></p> <p>Vertical _____ m.m.</p> <p>Horizontal _____ m.m.</p>
---	----------------------------------	--