

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
UNIDAD ACADÉMICA DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Enterococcus faecalis* EN CONDUCTOS
RADICULARES CON FRACASO ENDODÓNTICO**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN ODONTOLOGÍA

Presenta:

MARCO ANTONIO RAMÍREZ SALOMÓN

Directores de Tesis

M.O. NARDA YADIRA AGUILAR OROZCO

M. EN C. SANDRA ELENA HERNÁNDEZ SOLÍS

Tepic, Nayarit, diciembre de 2010



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

Tepic, Nayarit, 6 de diciembre de 2010.
Oficio No 147/10.

C.D. Marco Antonio Ramirez Salomón
Candidato a Maestro en Odontología
Presente.

En virtud de haber recibido información de los revisores asignados por esta Comisión acerca de que el trabajo de tesis de Maestría titulado: **Detección molecular de Enterococcus faecalis en conductos radiculares con fracaso endodóntico**, en la cual participan como Directores: M.O. Narda Yadira Aguilar Orozco y M.C. Sandra Elena Hernández Solís, ha sido revisada y se han extendido en forma escrita las recomendaciones que ellos han considerado necesarias, en nuestra calidad de cuerpo colegiado, estamos otorgando autorización para que se proceda a la impresión de dicho trabajo.

Una vez concluidos los trámites administrativos correspondientes, le serán notificados lugar, fecha y hora, donde se llevará a cabo el examen de grado defendiendo su tesis con réplica oral.

ATENTAMENTE
"POR LO NUESTRO AJO UNIVERSAL"

M.O. Rogelio Díaz Peña

Por la Comisión Asesora Interna de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación.

C.c.p. - Interesado
C.c.p. - Archivo

AGRADECIMIENTOS

Ante todo a DIOS, por permitirme vivir esta maravillosa vida.

Mi profundo agradecimiento a las personas que desinteresadamente invirtieron esfuerzo, tiempo y conocimientos indispensables para la materialización del presente proyecto.

Iniciando por mis directoras de tesis, Maestras Sandra Helena Hernández Sollis y Narda Yadira Aguilar Orozco, quienes, a través de su ayuda, y atinado consejo hicieron posible la presente empresa.

Al personal del departamento de Microbiología y Biología molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, por su invaluable asistencia. En especial el apoyo de Daniela Romero Salazar.

A nuestro coordinador Dr Florencio Rueda Gordillo. Gracias a su empeño, y gestión, asegurándose de facilitar cada una de las etapas del programa.

Al personal académico y administrativo de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nayarit, su calidez y amabilidad hicieron más sencilla la consecución de la presente.

Al director de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, Maestro José Luis Villamil Urzaiz, por su imprescindible apoyo y liderazgo, factor determinante en todo este proceso.

A todos ustedes mi cariño y eterno reconocimiento, sin ustedes no hubiera sido posible la realización de esta Maestría.

A mi madre Delta Marfa, a mi esposa Celina y a mis hijos Marco, Esteban y
Celina.

Por ustedes vale la pena todo este esfuerzo

RESUMEN

El tratamiento de conductos radiculares presenta un índice de fracaso, según publicaciones internacionales, entre el 5 y 10%. En gran proporción de éstos (del 24 al 77%), se han identificado bacterias de la especie *Enterococcus faecalis*. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Enterococcus faecalis* en conductos de dientes con tratamiento radicular fracasado efectuado en pacientes de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Este es un estudio observacional, transversal y descriptivo. Se estudiaron 34 muestras de DNA obtenidas de conductos radiculares de dientes con tratamientos de conductos radiculares fracasados, a los cuales se les aplicó la técnica de Reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para la identificación molecular de *Enterococcus faecalis*.

El *Enterococcus faecalis* fue encontrado en el 26.47%, en el grupo de dientes que presentaban fracaso de terapia de conductos radiculares en Mérida, Yucatán. Este resultado coincide con los trabajos publicados que demuestran su alta frecuencia en otras ubicaciones geográficas.

CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MATERIAL Y MÉTODOS	15
III.	RESULTADOS	20
IV.	DISCUSIÓN	21
V.	CONCLUSIONES	23
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
VII.	ANEXOS	35

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAHÍA



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MATERIAL Y MÉTODOS	15
III.	RESULTADOS	20
IV.	DISCUSIÓN	21
V.	CONCLUSIONES	23
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
VII.	ANEXOS	35

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUANAJUATO



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

I. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Uno de los problemas principales del tratamiento endodóntico es la presencia y permanencia de microorganismos en el interior de los conductos radiculares.

Según la Asociación Americana de Endodoncistas, la Endodoncia es una rama de la Odontología que se encarga del estudio de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental humana y tejidos perirradiculares. Su estudio y práctica contiene ciencias básicas y clínicas que incluyen la biología de la pulpa normal, la etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades e injurias a la pulpa y las condiciones perirradiculares asociadas (American Association of Endodontists Glossary of terms, 2010).

Los alcances de la Endodoncia incluyen, pero no se limitan, al diagnóstico diferencial y tratamiento de dolores orales de origen pulpar y periapical; terapia de la pulpa vital como el recubrimiento pulpar y la pulpotomía; tratamiento no quirúrgico del sistema de conductos radiculares con o sin patología perirradicular de origen pulpar y la obturación de esos sistemas de conductos radiculares; remoción quirúrgica selectiva de los tejidos patológicos resultantes de la patología pulpar; reimplante intencional y reimplante de dientes avulsionados; remoción quirúrgica de estructuras dentales tales como apicectomía, bicuspidización, hemisección y resección radicular; retro-obturación; implantes endodónticos; blanqueamiento de dentina y esmalte decolorado; retratamiento endodóntico y procedimientos relacionados con la restauración coronal, como preparación para poste y colocación del mismo.

Los alcances de la endodoncia son amplios, entre los cuales, el tratamiento de conductos es uno de los principales (American Association of Endodontists Glossary of terms, 2010).

El objetivo del tratamiento de conductos radiculares es mantener a la pieza dental libre de patología. Sin embargo, cuando este procedimiento no logra eliminar microorganismos existentes en el proceso infeccioso, o si estos fueran inoculados *a posteriori*, podría presentarse fracaso en el tratamiento.

Aunque se considera que la eliminación de la infección intraconducto redundará en mayor índice de éxito Ng, en 2007, reportó que el índice de fracasos fluctuaba del 4 al 69%.

Se han reportado cuatro tipos principales de microorganismos en tratamientos no exitosos: *Streptococcus spp*, *Actinomyces spp*, *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, la mayor frecuencia, tanto en cultivos como en pruebas moleculares, corresponde al *Enterococcus faecalis*, por lo que su estudio ha despertado mayor interés que otros microorganismos presentes en esos casos.

El análisis a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) representa un valioso auxiliar en la detección de la microflora bacteriana, especialmente la anaerobia, ya que entre sus ventajas destacan la exactitud de sus resultados, la posibilidad de evitar las dificultades que conlleva realizar el cultivo de microorganismos anaerobios.

La atención de fracasos endodónticos en los consultorios dentales es habitual, por lo tanto, es importante identificar la flora bacteriana persistente en los casos que requieran retratamiento. Esto permitiría confirmar la ejecución de los

protocolos ya establecidos para su eliminación o, si fuera necesario, diseñar otro tipo de tratamiento encaminado a su erradicación.

Con base a lo anteriormente expresado, se plantea el siguiente cuestionamiento que da pie a este trabajo de investigación:

¿Cuál será la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares de las piezas dentales con fracaso endodóntico de los pacientes que acuden a consulta a la clínica del posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Marco teórico

Las piezas dentarias están expuestas a diversos agentes que pueden poner en riesgo su permanencia en el arco dentario. Traumatismos, problemas periodontales y caries son considerados los principales eventos nosológicos que las afectan. Además, la pulpa dental puede sufrir inflamación o necrosis como resultado de los mismos. En tal caso, la única alternativa a la extracción del diente, será el tratamiento de conductos radiculares.

La endodoncia es un procedimiento que tiene como finalidad el mantenimiento de los órganos dentarios en su sitio y en óptimo estado de salud. Se define como la rama de la Odontología que se encarga del estudio de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental, y los tejidos perirradiculares. Su análisis y práctica comprenden las ciencias clínicas básicas que incluyen biología de la pulpa normal, etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades y lesiones pulpares; así como los estados perirradiculares afines

(Walton, 2001).

El tratamiento de conductos radiculares, como parte de los alcances de la endodoncia, se realiza llevando a cabo el vaciamiento del contenido pulpar del interior de los conductos radiculares de las piezas dentarias. Posteriormente se procede a la limpieza y desinfección de los mismos y finalmente se rellenan los espacios con materiales que procuran un sellado tanto en el extremo coronal como el apical (Walton, 2001).

Se considera que el tratamiento de conductos radiculares correctamente desarrollado arroja actualmente un índice de éxito promedio de 90-95% (Friedman, 2002). Sin embargo, en la literatura se encuentra una gran discrepancia en los resultados. En una revisión realizada por Friedman, en 2004, encontró porcentajes de éxito que variaron desde el 73% hasta el 97% en las últimas 5 décadas.

Los fracasos en los tratamientos de conductos han sido objeto de investigación a nivel global. El investigador que obtuvo el más bajo índice de periodontitis apical crónica, lesión radiolúcida derivada de un proceso endodóntico no exitoso, fue Soikkonen, en 1995, en Finlandia con 16%; Sidaravicius, en 1999, encontró 35% en Lituania; De Moor, en 2000, registró una prevalencia del 40.4% en Bélgica; Kirkevang, en Dinamarca, obtuvo un aproximado de 50% de fracasos en tratamientos de conductos radiculares en 2001; los fracasos en Canadá registraron un 44% y 51% según Dugas en 2003. Estos estudios fueron hechos en poblaciones donde los tratamientos de conductos se realizaron tanto por dentistas generales como por personal especializado en el área

endodóntica. Es probable que los tratamientos efectuados por dentistas sin la especialización correspondiente incurran en menor éxito a largo plazo. Circunstancia que podría incidir en la obtención de más alto índice de fracaso en la terapia, que si la muestra hubiera sido tomada exclusivamente de tratamientos realizados por especialistas en endodoncia (Eriksen, 2002).

Según Friedman, en 1998, el tratamiento de conductos radiculares exitoso debe incluir la existencia de alguno de los siguientes requisitos:

1. Normalidad clínica y radiográfica, consistente en la ausencia de signos como inflamación, enrojecimiento o fistula en la zona del órgano dentario tratado. Ausencia de dolor a la percusión sobre la pieza dental, palpación en la gíngiva y fondo de saco y ausencia de radiolucidez periapical en la radiografía.

2. Normalidad clínica con reducción de la radiolucidez apical, que se manifiesta como la ausencia de los signos y síntomas antes mencionados y reducción en el tamaño de la radiolucidez apical en la radiografía.

3. Normalidad clínica con radiolucidez persistente o estable, en casos sin sintomatología y mantenimiento de la lesión sin crecimiento ni disminución en tamaño.

El fracaso de la terapéutica endodóntica puede llevar a la pérdida de la pieza dental, impactando negativamente en todo el funcionamiento masticatorio. Con base en los requisitos de éxito endodóntico, el fracaso sería un tratamiento de conductos que presente alguno de los siguientes estados: sintomatología dolorosa a la percusión, palpación o espontánea, persistencia de tracto fistuloso, inflamación posterior a un mes del tratamiento. Así como también,

aparición o aumento de radiolucidez apical.

Las causas de los fracasos son variadas, resaltando entre las más frecuentes las fracturas radiculares y presencia de microorganismos en el área apical (Friedman, 2002).

La persistencia de la infección intraconducto después de realizado el tratamiento endodóntico, se relaciona con limpieza insuficiente por parte del operador o de reinfección por mal sellado que permitió el ingreso de bacterias de la cavidad oral. En estos casos, los esfuerzos por identificar a los microorganismos responsables han revelado un panorama en el que claramente resaltan unos pocos patógenos (Stuart *et al*, 2006).

Contrasta con la periodontitis apical primaria, definida como aquella infección en la cavidad pulpar y zona periapical de origen endodóntica, manifestada radiográficamente como una zona radiolúcida (Walton, 2001). Se presenta en ausencia de tratamiento endodóntico previo y se caracteriza por ser una infección polimicrobiana con predominancia de bacterias anaeróbicas estrictas (Yoshida *et al*, 1987; Haapasalo, 1989; Sundqvist *et al*, 1989; Baumgardner y Falker, 1991).

En los casos donde el tratamiento de conductos radiculares fracasó, las bacterias anaerobias estrictas representan la minoría de la población y su aislamiento es menos frecuente. Aquí las bacterias facultativas son la masa principal de comensales, lideradas con gran ventaja por el *Enterococcus faecalis*, que es el más frecuentemente aislado. La presencia de este microorganismo ha sido reportada entre 24 a 77% en estos casos (Molander *et*

al, 1998; Sundqvist *et al*, 1998; Hancock *et al*, 2001; Pinheiro *et al*, 2003).

El ambiente ecológico del interior de un conducto radicular, resultado de una terapia endodóntica, presenta especiales características. Se han retirado del conducto gran parte de los nutrientes y colocado antibacterianos provocando una selección de microorganismos sobrevivientes (Chávez de Paz, 2004).

Ahora, estos microorganismos exhiben características especializadas que al mismo tiempo que les permiten vivir en estos ambientes, los convertiría en patógenos potenciales. Conocerlos reviste de gran importancia por la participación que podrían tener en el desarrollo de fracasos en los tratamientos de conductos (Stuart *et al*, 2006).

Como se mencionó, el *Enterococcus faecalis*, es el microorganismo más frecuentemente aislado en casos de fracaso de tratamiento de conductos. Es un anaerobio facultativo, Gram positivo. Las células de *Enterococcus faecalis* son ovoides o esféricas, y se agrupan en pares o pequeñas cadenas, según su estado ambiental. Se sabe que posee la capacidad de crecer en un ambiente de 6.5% de NaCl, y puede sobrevivir 30 minutos a 60°C en un pH de 9.6 (Portenier *et al*, 2003). El organismo es resistente a la mayoría de los medicamentos utilizados intraconducto, y su tolerancia a pH superiores de 11 podría ser la razón del por qué este microorganismo sobrevive al tratamiento antimicrobiano con hidróxido de calcio (Bystrom *et al*, 1985). Esta resistencia probablemente ocurre en virtud de su capacidad de regular su pH interno con una eficiente bomba de protones (Evans *et al*, 2002). El *Enterococo faecalis* también puede sobrevivir prolongados periodos de inanición (Figdor *et al*,

2003), así como también, desarrollarse como una mono infección, con ausencia de sinergismo con otras bacterias (Fabricius *et al*, 1982).

Los Enterococos, en general, son bacterias que normalmente forman parte de la microbiota de la boca y tracto gastrointestinal. Han recibido el reconocimiento como patógenos humanos potenciales causando el 12% de las infecciones intrahospitalarias, que incluyen infecciones urinarias, intraabdominales y endocarditis infecciosa (Portenier *et al*, 2003; Kayaoglu y Orstavik, 2004). Estos microorganismos pueden crecer y sobrevivir en ambientes áridos de tal manera que pueden ser detectados en el suelo alimentos, agua, plantas e inclusive en animales como pájaros e insectos (Facklam *et al*, 1999).

El género *Enterococcus* contiene a 23 especies que se subdividen en 5 grupos basados en su capacidad de interacción con el manitol, sorbitol y la arginina. El *Enterococcus faecalis* pertenece al mismo grupo del *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundii* y *Enterococcus gallinarum*. Este responde negativamente a la arabinosa y, excepto por algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza el piruvato y tolera el telurito (Molander *et al*, 1998).

Ha quedado establecido que el *Enterococcus faecalis* se encuentra en la cavidad oral, en las infecciones de conductos radiculares y en casos de tratamientos de conductos fracasados. Posee la habilidad de colonizar el conducto radicular y sobrevivir en el después de un tratamiento endodóntico. Así también, podría tener la capacidad de generar enfermedad pulpar y periapical en función de su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y

mantenerse viable en su interior (Stuart *et al*, 2006).

Respecto al posible mecanismo que explique cómo este microorganismo puede sobrevivir dentro de los túbulos dentinarios para reinfectar el conducto obturado se han desarrollado varios trabajos de investigación. Love, en 2001, realizó un estudio en el cual colocó muestras conteniendo *Enterococcus faecalis* en caldo de infusión cerebro-corazón que contenía distintas cantidades de suero humano por un período de 56 días. Demostró que las células de este microorganismo se mantenían viables y eran capaces de penetrar en los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno tipo I presente en la dentina en presencia de suero humano (Love, 2001).

Respecto a la medicación intraconducto con Hidróxido de calcio, que presenta pH de 12.5 en las áreas donde hace contacto, Mc Hugh *et al*, en 2004, evaluaron el pH necesario para inhibir *in vitro* su crecimiento y demostraron que se necesita pH mayor de 11 para la erradicación de este microorganismo. No obstante, la ubicación del *Enterococcus faecalis* dentro de los túbulos dentinarios es desconocida por lo que el pH crítico por arriba de 11 (umbral de erradicación) podría no lograrse. Esto supone la supervivencia y capacidad de reinfección posterior al tratamiento de conductos.

La presencia de *Enterococcus faecalis* en casos de necrosis pulpar con o sin periodontitis apical crónica se ha reportado menor que en los casos de tratamientos radiculares fallidos (Stuart *et al*, 2006). La explicación podría ser el antagonismo microbiano en el ambiente intraconducto no tratado, generadas bien sea por la competencia entre especies por los nutrientes del medio, o por

la producción de sustancias por parte de los microorganismos anaerobios estrictos (bacteriocinas) que inhiban el crecimiento o su permanencia en el mismo (Stuart *et al*, 2006).

El *Enterococcus faecalis* posee un gran número de factores de virulencia que le permiten la colonización, competencia, resistencia en contra de los mecanismos de defensa del huésped, y la inducción de cambios patológicos generados por enzimas tóxicas (Portenier *et al*, 2003, Kayaoglu y Orstavik, 2004).

Algunos de los factores de virulencia son: sustancia de agregación (adhesina bacteriana que convierte la superficie de la bacteria donadora en una superficie adherente potencial para las células receptoras) (Portenier *et al*, 2003; Kayaoglu y Orstavik, 2004), adhesinas o proteínas de superficie (relacionadas con la formación de biopelículas y con la adherencia del microorganismo) (Shankar *et al*, 1999; Toledo *et al*, 2001; Hubble *et al*, 2003), feromonas sexuales (péptidos que promueven la transferencia conjugativa de plásmidos de ADN entre las cepas) (Kayaoglu y Orstavik, 2004; Jett *et al*, 1994), ácido lipoteicoico (polímeros asociados a la pared celular que estimulan a los leucocitos a liberar mediadores de la respuesta inflamatoria) (Kayaoglu y Orstavik, 2004), superóxido extracelular (radicales de oxígeno altamente reactivos relacionados con el daño tisular y celular) (Kayaoglu y Orstavik, 2004), gelatinasa (metaloproteínasa extracelular que hidroliza gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina e inulina) (Kayaoglu y Orstavik, 2004; Jett *et al*, 1994), hialuronidasa (enzima que degrada el ácido hialurónico) (Kayaoglu y Orstavik, 2004) y hemolisina (codificada por plásmidos, la cual es producida por

cepas β -hemolíticas de *Enterococcus faecalis* y produce lisis total de los eritrocitos, además de destruir polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos) (Portenier *et al*, 2003).

El potencial de exhibir estos factores le otorga al *Enterococcus faecalis* la capacidad de sobrevivir en medios con pocos nutrientes, así como la invasión de áreas inaccesibles a la limpieza, irrigación y medicación intraconducto (Portenier *et al*, 2003; Kayaoglu y Orstavik, 2004; Stuart *et al*, 2006).

Por consiguiente, posee gran capacidad de supervivencia en la mayoría de los ambientes hostiles, aún en presencia de hidróxido de calcio (CaOH_2). El CaOH_2 es un producto usado como antibacteriano en endodoncia que posee pH de 12.5. Este grado de alcalinidad es desfavorable para el crecimiento bacteriano, excepto para muy pocos patógenos, entre los cuales se encuentra el *Enterococcus faecalis*. Ante este panorama es entendible el por qué, aunque no es un microorganismo común en necrosis pulpares, si puede sobrevivir en casos de tratamientos de conductos no exitosos (Chávez de Paz, 2004).

Sin embargo, otras especies microbianas se han aislado en tratamientos de conductos reportados como fracaso. Principalmente, pero con frecuencias variables, se encontró *Actinomyces spp.* (Molander *et al*, 1998; Hancock *et al*, 2001; Sundqvist *et al*, 1998; Cheung y Ho, 2001; Pinheiro *et al*, 2003), *Candida albicans* (Molander *et al*, 1998), *Streptococcus* alfa y no hemolíticos, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Candida albicans* (Waltimo *et al*, 1999).

La tenacidad y persistencia de estos microorganismos ha motivado el diseño de

procedimientos de limpieza e irrigación de conductos radiculares encaminados a su máxima erradicación. La sistematización de los mismos corresponde con el diagnóstico y obedece a los hallazgos microbiológicos reportados en la literatura mundial (Zehnder, 2006).

Las técnicas de aislamiento e identificación bacteriana han mejorado sustancialmente en los últimos 30 años, sin embargo, existen diferencias entre países con respecto a la prevalencia de especies involucradas en las infecciones endodónticas (Sundqvist, 1976; Yoshida *et al*, 1987; Haapasalo, 1989; Baumgartner y Falkler, 1991; Drucker *et al*, 1992; Gomes *et al*, 1994; Khemaleelakul *et al*, 2002). Aunque estas diferencias podrían ser atribuidas a las metodologías de identificación, se sospecha de una influencia geográfica en la composición microbiana de los conductos radiculares infectados (Baumgardner *et al*, 2004). Se desconoce constitución microbiológica de los conductos radiculares infectados en la población mexicana y si es semejante a la encontrada en diferentes áreas geográficas del mundo.

Los mecanismos de defensa del huésped, predisposición genética y factores ambientales tales como calidad del agua, cantidad de gente infectada por las mismas especies, estrés psicológico, tabaquismo, cuidado dental y enfermedades infecciosas podrían ser factores determinantes en la colonización bacteriana de la cavidad oral. Además las condiciones climáticas y hábitos alimenticios podrían afectar la composición de la microflora, lo que explicaría las diferencias en prevalencia de algunas especies (Umeda *et al*, 1998).

Los factores étnicos también parecen ser factores de influencia. Algunos

estudios demostraron que diferentes grupos étnicos difieren en la presencia de patógenos periodontales. Umeda *et al*, (1998) reportaron que los hispanos y asiático-americanos mostraban mayor riesgo de presentar *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en comparación con grupos caucásicos. Los afroamericanos mostraron riesgo mayor de presentar *P. gingivalis* en saliva y cavidad oral, así como también, menor riesgo de presentar *Treponema denticola* (Ide *et al*, 2000).

Las diferencias entre los factores determinantes de colonización microbiana, tanto ambientales como genéticos, podrían explicar las diferencias en prevalencia de algunos patógenos orales entre poblaciones. Se ha reportado la necesidad de un estudio global para determinar las posibles variables y las condiciones ecológicas que seleccionan las especies microbianas en infecciones endodónticas, incluyendo las infecciones persistentes en endodoncias fracasadas (Baumgardner *et al*, 2004).

Para la identificación de microorganismos, se han utilizado dos métodos, el cultivo bacteriano y las técnicas moleculares. En el estudio de Molander, en 1998, en un tercio de los casos de retratamiento con periodontitis apical, las muestras resultaron negativas, sugiriendo que la toma de muestras utilizada para la detección de especies cultivables no era invariablemente la óptima.

En general, los métodos moleculares son más fáciles, más rápidos y precisos que los métodos de cultivo (Baumgardner, 2004). Debido a su capacidad de detección e identificación, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha vuelto una herramienta popular para el análisis de bacterias en infecciones

endodónticas (Elkins *et al*, 1994; Bae *et al*, 1997; Conrads *et al*, 1997; Baumgardner *et al*, 2000; Siqueira *et al*, 2001; Moraes *et al*, 2002; Siqueira y Rocas, 2003; Siqueira *et al*, 2003; Rocas *et al*, 2003).

Justificación

Diversos estudios han dado como resultado que *Enterococcus faecalis* sea considerado principal agente etiológico de las infecciones endodónticas secundarias. Debido a la alta prevalencia de este microorganismo en estos casos, se ha establecido un protocolo de desinfección para su erradicación.

Por otro lado, se sabe que individuos de diferentes regiones del mundo presentan diferencias en la flora bucal. Esta discrepancia geográfica y étnica podría influir en el tipo de especies bacterianas presentes en los casos de conductos con tratamientos fracasados.

En México no se tienen reportes acerca de la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en los tratamientos radiculares fracasados utilizando métodos moleculares para su identificación. La alta frecuencia reportada de este microorganismo en tratamientos radiculares fracasados motivó a investigar la prevalencia de este microorganismo en los conductos con fracaso endodóntico en pacientes de la Universidad Autónoma de Yucatán; ya que los datos que se tienen son de estudios realizados en el extranjero.

Por otro lado, en este estudio se utilizará la prueba de la PCR para la identificación de *Enterococcus faecalis*, método de identificación poco utilizado en el área odontológica, ya que ha demostrado ser una herramienta de identificación molecular rápida, eficiente y de alta sensibilidad.

Los resultados de este estudio contribuirán a establecer la relación de este microorganismo con los casos de fracasos endodónticos en el estado de Yucatán.

Objetivo general

Identificar *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares con tratamiento de conductos fracasados mediante la técnica de Reacción de la Cadena de Polimerasa

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Estudio descriptivo, observacional y transversal.

Definición del universo

Todas las piezas dentales de pacientes que acudieron a la clínica del postgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) con diagnóstico de tratamiento de conductos fracasado.

Definición de las unidades de observación

Criterios de inclusión

1. Pacientes que aceptaron participar en el estudio.
2. Conductos radiculares con ápice maduro.
3. Dientes en los que se pudo llevar a cabo el aislamiento absoluto.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que recibieron antibioticoterapia dentro de los 3 meses previos a la toma de la muestra.
2. Dientes con fractura radicular.
3. Dientes con bolsas periodontales.

Criterios de eliminación

1. Conductos con instrumento fracturado en su interior.
2. Contaminación del campo operatorio al momento de extraer la muestra.

Tamaño de la muestra y muestreo

Se incluyó a todos los pacientes que acudieron a la clínica de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán, que fueron diagnosticados con fracaso de tratamiento de conductos, en el periodo comprendido del mes de mayo de 2009 a marzo de 2010.

Preceptos éticos y riesgos

El paciente firmó una carta de consentimiento informado donde se le notificó que la investigación no implicaba riesgo para el paciente ni para el investigador (Anexo II).

Procedimiento Experimental

Cultivo de la cepa de referencia. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, esta cepa fue cultivada y se le extrajo el DNA el cual sirvió como control positivo de la PCR. La cepa liofilizada fue cultivada en caldo Schaedler a 37°C durante 48 hrs. en anaerobiosis y posteriormente, se inoculó una porción del caldo en el medio de cultivo Agar-Schaedler adicionado con vitamina K y hemina y se incubó durante 8 días a 37°C en anaerobiosis. Se hizo un frotis de las colonias crecidas y se tiñó con la tinción de Gram para observar al microscopio la morfología bacteriana propia de *Enterococcus faecalis*. (Anexo III, fotografía 1).

Toma de muestra

Se tomaron muestras de 36 piezas dentales de pacientes que acudieron a la clínica del postgrado de endodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán,

en el periodo comprendido de mayo de 2009 a marzo de 2010, que presentaron fracaso de tratamiento de conductos. Posterior a la elaboración de historia clínica y firma de consentimiento informado, se administró anestesia local al paciente y se efectuó aislamiento absoluto con dique de goma. Se desinfectó la cavidad de acceso y el dique de hule con peróxido de hidrógeno al 3% e hipoclorito de sodio al 2.5%; posteriormente se inactivó el hipoclorito de sodio con una solución estéril de tiosulfato de sodio al 5%. Se creó un acceso recto y directo hacia la entrada de los conductos radiculares eliminando toda la caries o materiales restaurativos que existieran, con fresa de carburo de alta velocidad estéril.

A partir de ese momento se avanzó sin irrigación ni desinfectante alguno hacia el tercio apical de los conductos radiculares cuidando de retirar gutapercha y sellador exclusivamente con limas manuales y rotatorias. El material de obturación de conductos en el primer tercio radicular se removió usando fresas Gates Glidden estériles y el material apical se recuperó usando limas K-type o Hedstrom y puntas de papel. En los casos de presencia de poste, éste se removió empleando vibración ultrasónica y fresa de carburo de alta velocidad estéril. No se usaron solventes químicos para remover el material de obturación del interior del conducto. El material recuperado se transfirió a los viales con buffer de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA [pH 7.6]1 mM).

Una vez removido el material de obturación del interior del conducto, se introdujo, con ayuda de una jeringa de 10 ml., una pequeña cantidad de

solución salina al canal radicular y se limaron las paredes para obtener limalla dentinaria infectada.

Posteriormente se introdujeron puntas de papel no. 20 para absorber el contenido del conducto, posteriormente las puntas de papel conteniendo la muestra se colocaron en tubos eppendorff que contenían buffer TE 1X y se llevaron al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular para su conservación a -70°C hasta el momento de proceder a la extracción del DNA.

Método de PCR. Extracción de DNA de las muestras obtenidas. Los viales que contenían las puntas de papel con las muestras se descongelaron hasta alcanzar temperatura ambiente y la muestra se resuspendió en el buffer TE agitando en el vortex durante un minuto. Posteriormente la suspensión microbiana se transfirió a un tubo de eppendorff y se centrifugó a 4000 rpm durante 2 minutos. Enseguida el precipitado se lavó resuspendiéndolo en 200µl de agua inyectable estéril y se centrifugando en las mismas condiciones, este paso se realizó tres veces. Después del último lavado, el precipitado se resuspendió en 200µl de agua inyectable y se calentó a 95°C por diez minutos, inmediatamente después se enfrió introduciendo los viales en hielo durante cinco minutos. El vial se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, para remover los desechos celulares así como las células que no se hubiesen roto. El sobrenadante se recolectó en un vial y se le midió la cantidad de DNA extraído mediante espectrofotometría.

Técnica de PCR. Amplificación. Se utilizó el par de oligonucléotidos específico para *Enterococcus faecalis*, el cual amplifica una secuencia de 310 pb:

PRIMER: EF1 (DNA) – GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG

PRIMER: EF2 (DNA) – CCG TCA GGG GAC GTT CAG

Se preparó una mezcla de reacción a un volumen final de 50 µl: 5 µl de buffer PCR 10X, 2 µl de MgCl₂ (2 mM), 1 µl del nucleótido (2 µM), 1 µl de dNTPs (0.2mM), 0.25µl de Taq polimerasa (invitrogen), 1µl del templado de DNA (10ng) y 38.75µl de agua inyectable (Anexo III, fotografía 2).

La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: calentamiento a 95°C por 2 min. 36 ciclos de 30 seg. a 95°C, 1 min. a 60°C, 1 min. a 72°C y un ciclo de extensión final de 72°C durante 2 min. En cada amplificación se incluyó un control positivo y uno negativo.

Electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE (Tris-EDTA-Borato de sodio) 1X a un voltaje constante de corrida de 10 V durante un tiempo de 20 horas. En cada gel se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. (Anexo III, fotografía 3) El gel se tiñó con bromuro de etidio, posteriormente se observó con la ayuda de una lámpara de luz Ultravioleta y se procedió a tomar fotografías del resultado.

III. RESULTADOS

Se tomaron 36 muestras de conductos radiculares con tratamiento endodóntico fracasado. Del total de muestras obtenidas, en 34 pudo extraerse el DNA.

De las 34 muestras de DNA extraídas y sometidas a la prueba de PCR, 9 (26.47%) resultaron positivas (Anexo IV. Gráfica 1).

Las muestras fueron consideradas como positivas, cuando se visualizó el fragmento de DNA con un peso molecular de 310 pb correspondiente a *Enterococcus faecalis* (Anexo III, fotografía 4).

IV. DISCUSIÓN

El éxito de un proceso terapéutico está relacionado íntimamente con su etiología, el agente etiológico en los casos de fracaso endodóntico juega un papel preponderante en el pronóstico del retratamiento endodóntico. Por esta razón, se le ha prestado atención a la flora bacteriana residente en los casos de dientes con tratamientos radiculares fracasados y se ha encontrado una limitada variedad de agentes bacterianos capaces de sobrevivir en el ambiente adverso creado en el interior de un conducto obturado (Stuart *et al*, 2006).

No obstante que, *Enterococcus faecalis* se encuentra entre los microorganismos más frecuentemente encontrados en los fracasos endodónticos, no ha sido posible demostrar su responsabilidad ya que puede encontrarse de forma natural en la cavidad oral (Stuart *et al*, 2006).

Su alta prevalencia en los casos de retratamiento endodóntico ha sido demostrada en diversos estudios, Molander *et al*, en 1998, encontró una prevalencia del 47%; así también Sundqvist *et al*, en 1998, encontró prevalencia del 38%; Peculienne *et al*, en el 2000, reportó un 70%; el mismo investigador, en 2001, lo reportó en 64%; Hancock *et al*, en el mismo año, del 33%; Pinheiro *et al*, también en el 2001 y en el 2003, reportó prevalencias del 53% y el 46% respectivamente.

En este estudio se encontró una prevalencia del 26.47%, semejante a lo reportado por Engstrom, en 1964, que reportó una prevalencia del 24% y Moller en 1966, que reportó prevalencia del 28%. Es importante hacer notar que en estos estudios se utilizaron métodos de cultivo bacteriano.

Estudios en los que se ha empleado a la PCR para la identificación de *Enterococcus faecalis* reportan altas prevalencias, tal es el caso de Siqueira que encontró una prevalencia de 77% (Siqueira y Rocas, 2004), y Rocas que reportó una prevalencia del 67% (Rocas *et al*, 2004). La discrepancia entre los resultados reportados, pueden deberse, a las diferencias entre las técnicas de identificación empleadas y a la localización geográfica o grupos étnicos estudiados (Baumgardner *et al*, 2004). Esta es una conclusión del autor que no debe de agregarse ni en sus conclusiones pues estas derivan de su trabajo y no de otros autores. (Hay que quitarla de aquí).

V. CONCLUSIONES

La prevalencia de *Enterococcus faecalis* fue menor a la encontrada en estudios similares.

Los resultados de este estudio confirmaron la presencia de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares con tratamiento endodóntico fracasado, por lo que es importante llevar a cabo la correcta ejecución de los protocolos de limpieza e irrigación intraconducto durante el tratamiento endodóntico.

La técnica de la PCR mostró ser una prueba de diagnóstico rápida, siempre y cuando se lleve un estricto control protocolario durante la extracción del DNA y la preparación de la mezcla de reacción.

Es importante continuar realizando estudios de este tipo que contribuyan a establecer la prevalencia de este microorganismo en nuestro país.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Endodontists Glossary of terms 2010.

http://www.aae.org/Patients/Your_Office_Visit/Glossary_of_Terms.aspx

Bae K, Baumgardner JC, Xia T, Whitt B. y L. David (1997) "SDSPAGE and PCR for differentiation of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens*. *J Endod* 25: pp 324–328.

Baumgardner JC (2004) "Microbiological and molecular analysis of endodontic infections". *Endodontic Topics* 7: pp 35–51.

Baumgardner, JC, Siqueira JF, Xia T y N. Rocas (2004) "Geographical Differences in Bacteria Detected in Endodontic Infections Using Polymerase Chain Reaction". *J Endodon* 30: pp 141-4.

Baumgardner JC, Watts CM. y T. Xia (2000) "Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin". *J Endod* 26: pp 695–698.

Baumgardner JC. Y WA. Falkler Jr (1991). "Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals". *J Endodon* 17: pp 380–3.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G (1985) "The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium

hydroxide in the treatment of infected root canals phenol". *Endod and Dent Traumatol* 1: pp 170–5.

UNIVERSIDAD ALFONSO DE NAVARRA

Chavez de Paz L (2004). "Gram-positive organisms in endodontic infection". *Endod Topics* 9: pp 79–96.



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Cheung GS y MW Ho (2001) "Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions". *Oral Microbiol Immunol.* 16: pp 332–337.

Conrads G, Gharbia S, kishor G, Lampert F. y H. Shah (1997) "The use of 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria". *J Endod* 23: pp 433–438.

De Moor RJ, Hommez GM. De Boever JG, Delme KI Y GE Martens, (2000) "Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population". *Int Endod* 33: pp. 113–120.

Drucker D, Lilley J, Tucker D y C Gibbs (1992) "The endodontic microflora revisited". *Microbios* 71: pp 225–34.

Dugas NN, Lawrence HP, Teplitsky PE, Pharoah MJ Y S. Friedman (2003) "Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian populations". *Int Endod J* 36: pp 181–192.

Elkins D, Torabinejad M, Schmidt R, Rossi J y J Kettering (1994) "Polymerase chain reaction detection of human immunodeficiency virus DNA in human periradicular lesions". *J Endod* 20: pp 386–388.

Engstrom B (1964) "The significance of enterococci in root canal treatment". *Odontol Revy* 15: pp 87–106.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G. y D Figdor, (2002) "Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide". *Int Endod J* 35: pp 221–8.

Eriksen HM, Kirkevang LL y K Petersson (2002) "Endodontic epidemiology and treatment outcome: general considerations". *Endod Topics* 2: pp 1-9.

Fabricius L, Dahlen G, Holm SC y A Moller Jr (1982) "Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys". *Scand J of Dent Res* 90: pp 200–6.

Facklam R, Sahm D, y L Martins (1999). "Enterococcus". En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F y R Tenover editors (1999). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. Am Soc of Microbiol: pp 297-305.

Figdor D, Davies JK. y G Sundqvist, (2003) "Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum". *Oral Microbiol and Immunol* 18: pp 234-9.

Friedman S, y M. Chaim, (2004) "The success of endodontic therapy- healing and functionality". *J Cal Dent Assoc* 32: pp. 493-503

Friedman S. (1998) "Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy". In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. *Essential endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis*. Oxford: Blackwell Science.

Friedman S. (2002) "Prognosis of initial endodontic therapy". *Endod topics* 2: pp 59-88.

Gomes B, Drucker D y J Lilley (1994) "Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals". *Microbios* 94;80: pp 231-43.

Haapasalo M. (1989) "*Bacteroides* spp. in dental root canal infections". *Endod Dent Traumatol* 5: pp 1-10.

Hancock HHI, Sigurdsson AD, Trope MB Y JB Moiseiwitsch (2001) "Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 91: pp 579-586.

Ide L, Lotufo RFM, Contreras A, Bergamashi O y J Slots (2000) "Occurrence of seven putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of two native populations in the Xingu Indian Park". *Anaerobe* 6: pp 135–7.

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE y MJ Gillepsie (2003) "Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin". *Oral Microbiol Immunol* 18: pp 121-6.

Jett B, Huycke M y M Gilmore (1994) "Virulence of enterococci". *Clin Microbiol Rev* 7: pp 462-78.

Kaufmann B, Spangberg L, Barry J y A Fouad (2005) "Enterococcus spp. In Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions". *J Endod* 31: pp 851-6.

Kayaoglu G Y Ørstavik D. (2004) "Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease". *Crit Rev Oral Biol Med* 15: pp 308–320.

Khemaleelakul S, Baumgartner JC y S. Pruksakom (2002). "Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94: pp 746–55.

Kim S y S Kratchman (2006) "Modern endodontic surgery concepts and practice: A review". *J endod* 32: pp 601-23.

Kirkevang LL, Horsted-Bindslev P, Ørstavik D y A Wenzel (2001) "A comparison of the quality of root canal treatment in two Danish subpopulations examined 1974–75 and 1997–98". *Int Endod J* 34: pp 607–612.

Love R (2001) "*Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure". *Int Endod J* 34: pp 399-405.

Mc Hugh C, Zhang P, Michalek S y P Eleazer (2004) "pH required to kill *Enterococcus faecalis* *in vitro*". *J Endod* 30: pp 218-9.

Molander A, Reit C, Dahlen G y T Kvist (1998) "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis". *Int Endod J* 31: pp 1-7.

Moller AJR (1966) "Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth". *Odontol Tidskr* 74(suppl) 1:380.

Moraes S, Siqueira JF Jr, Colombo A, Rocas I, Ferreira M, y R. Domingues, (2002) "Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16s rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA–DNA hybridization for detection of *fusobacterium nucleatum* in endodontic infections". *J Endod* 28: pp 86–89.

Ng YL, Mann V y K Gulabivala (2002) "Outcome of secondary root canal treatment: A systematic review of the literature". *Int Endod J* 41: pp 1026-1046.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J y K Gulabivala (2007) "Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success". *Int Endod J* 40: pp 921-39.

Peculienė V, Balciuniene I, Eriksen HM y M Haapasalo (2000) "Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population". *J Endod* 26: pp 593-5.

Peculienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, M Haapasalo (2001) "Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis". *Int Endod J* 34: pp 429-34.

Pinheiro ET; Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB Y FJ. Souza-Filho (2003) "Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions". *Int Endod J* 36: pp 1-11.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA y FJ Souza-Filho (2003) "Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility". *Oral Microbiol Immunol* 18: pp 100-3.

Portenier I, Waltimo T y M Haapasalo (2003) "Enterococcus faecalis- the root canal survivor and "star" in post-treatment disease". *Endod Topics* 6: pp 135-59.

Rocas I, Siqueira JF Jr, Andrade A y M Uzeda (2003) "Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR". *Int Endod J* 36: 20-26.

Rocas I, Siqueira J y K Santos (2004) "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-20.

Shankar V, Baghdayan A, Huycke M, Lindahl G y M Gilmore (1999) "Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains are Enriched in Esp, a Gene Encoding a Novel Surface Protein". *Infect Immun* 67: pp 193-200.

Shin S, Jee S, Song J, Jung I, Cha J y E Kim (2008) "Comparison of Regrowth of *Enterococcus faecalis* in Dentinal Tubules after Sealing with Gutta-Percha or Resilon". *J Endod* 34: pp 445-8.

Sidaravicius, B.; Aleksejuniene, J. y HM. Eriksen, (1999) "Endodontic treatment and prevalence of apical periodontitis in an adult population of Vilnius, Lithuania". *Endod Dent Traumatol*, 15, pp. 210-215.

Siqueira JF Jr. (2001a) "Aethiology of root canal treatment failure: Why Well-treated teeth can fail". *Int Endod J* 34: pp 1-10.

Siqueira JF Jr, Rocas I, Oliveira J y K Santos (2001b) "Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin". *J Endod* 27: pp 563–566.

Siqueira JF Jr y I Rocas (2003) "PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *lecithinolyticum* in primary root canal infections". *Arch Oral Biol* 48: pp 495–502.

Siqueira JF Jr, Rocas I, Andrade A y M de Uzeda (2003) "Peptostreptococcus micros in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction". *J Endod* 29: pp 111–113.

Siqueira JF Jr, Rocas IN (2004) "PCR-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: pp 85-94.

Siqueira J y I Rocas. (2005) "Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic infections: Part 2 - Redefining the Endodontic Microbiota". *J Endod* 31: pp 488-98.

Soikkonen KT (1995) "Endodontically treated teeth and periapical findings in the elderly". *Int Endod J* 28: pp 200–203.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ y CB Owatz (2006) "*Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment". *J Endod* 32: pp 93-8.

Sundqvist G, Johansson E. y U. Sjogren (1989) "Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections". *J Endodon* 15: pp 13-9.

Sundqvist GK (1976) "Bacteriological studies of necrotic dental pulps". [*odontological dissertation no. 7*]. Umea, Sweden: University of Umea.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S y U Sjogren (1998) "Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: pp 86-93.

Toledo-Arena A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata *et al.* (2001) "The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation". *Appl Environ Microbiol* 67: pp .538-45.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL Y J Slots (1998) "Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 69: pp 1111-8.

Waltimo, TM.; Siren, EK.; Orstavik, D. y MP. Haapasalo, (1999) "Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro". *Int Endod J* 32, pp 94-98.

Walton RE y Torabinejad M (2001). "Principles and Practice of Endodontics". (3rd edition). W B Saunders Co.

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T. y H. Sagawa (1987) "Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis". *J Endodon* 13: pp 24–28.

Zehnder M (2006) "Root canal irrigants". *J Endod* 32: pp 389–398.

VII. ANEXOS

ANEXO I

Matriz para la operacionalización de variables

NOMBRE	DEFINICIÓN	INDICADOR (SI SE REQUIERE)	TIPO POR MEDICIÓN	ESCALA	CONSTRUCCIÓN	USO	FUENTE
Presencia de <i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria del género <i>Enterococcus</i> . Es un bacilo anaerobio facultativo, gram positivo. De células ovoides o esféricas. Se agrupan en pares o pequeñas cadenas, según su estado ambiental. Posee capacidad de crecer en un ambiente de 6.5% de NaOCl, y puede sobrevivir 30 min a 60 grados C en un pH de 9.6. (12) (Partenier endod topics 2003).	NO	Cualitativa	Nominal	NO	Determinar presencia de <i>Enterococcus faecalis</i>	Muestra tomada de conductos radiculares con fracaso endodóntico

ANEXO II

Hoja de consentimiento informado

"Detección molecular de *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares con fracaso endodóntico"

Investigador responsable: Marco Antonio Ramírez Salomón

A quien corresponda:

Por este medio, hago constar que he sido cabalmente informado (a) y doy mi consentimiento para que se realice un cultivo microbiológico a las muestras tomadas de mis piezas dentales sometidas a tratamiento endodóntico en la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán. Se me ha informado que al participar en esta investigación no existe riesgo para mi salud ni para mi integridad física.

El resultado de los datos obtenidos, radiografías y fotografías que se tomen podrán ser utilizadas para los fines que la investigación del C. D. Marco Antonio Ramírez Salomón requiera para su estudio y publicación.

Firma de consentimiento

Paciente

Testigo

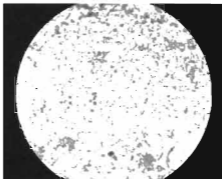
Mérida, Yucatán, México _____ de _____ de 20__.

ANEXO III
Fotografías

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN



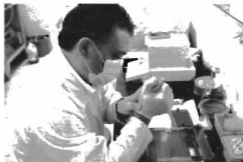
SISTEMA DE BIBLIOTECA



Fotografía 1. Tinción de Gram de *Enterococcus faecalis*. (Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán).



Fotografía 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en la cámara de flujo laminar (Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán).



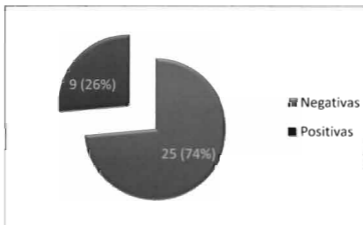
Fotografía 3. Colocación de la mezcla de la PCR amplificada en gel de agarosa al 1% para electroforesis (Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán).



Fotografía 4. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: marcador de PM de 100 pb, carril 3 control positivo, 5 muestra de conducto radicular con tratamiento fracasado, se visualizan fragmentos amplificadas con un peso molecular de 310 pb correspondientes a *Enterococcus faecalis*, carril 7 control negativo. (Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán).

ANEXO IV

Gráfica 1. Prevalencia de *Enterococcus faecalis* en conductos con tratamientos endodónticos fracasados



Fuente: Muestras de conductos radiculares con fracaso endodóntico obtenidas para el estudio.