

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

**Identificación molecular y asociación causal de microorganismos
presentes en lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico**

María Elisa Galárraga Vinueza
Valeri Paredes K., Dr., Director de Tesis
Gabriela Vasco, Dra., Directora de Tesis

Tesis de Grado presentada como requisito para la obtención del título de
Odontóloga

Quito, diciembre de 2014

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Identificación molecular y asociación causal de microorganismos presentes en
lesiones periapicales refractarias**

María Elisa Galárraga Vinueza

Valeri Paredes K., Dr.
Director de Tesis

Gabriela Vasco, Dra.
Directora de Tesis

Iván Bedoya, Dr.
Miembro del Comité de Tesis

José Maldonado, Dr.
Miembro del Comité de Tesis

Fernando Sandoval, Dr.
Miembro del Comité de Tesis y
Decano del Colegio de Odontología

Quito, diciembre de 2014

©Derechos de Autor:

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: María Elisa Galárraga Vinueza

C. I.: 1716168339

Fecha: Quito, diciembre de 2014

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia, amigos, compañeros y en especial a mis profesores quienes me compartieron lo mejor que se puede dar en la vida, “el conocimiento”.

Esta investigación está dedicada sobre todo al amor que siento por la profesión.

Creía en infinitas series de tiempos, en una red creciente y vertiginosa de tiempos divergentes, convergentes y paralelos. Esa trama de tiempos que se aproximan, se bifurcan, se cortan o que secularmente se ignoran, abarca todas las posibilidades. No existimos en la mayoría de esos tiempos; en algunos existe usted y no yo; en otros, yo, no usted; en otros, los dos. En éste, que un favorable azar me depara

(Borges, 1944)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis papás y hermana quienes me apoyaron en todos los momentos de mi carrera profesional y han sido un ejemplo de amor, perseverancia e inteligencia.

Agradezco a todos mis profesores también en especial a mis tutores Dr. Valeri Paredes y Dra. Gabriela Vasco quienes me guiaron para realizar esta tesis y compartieron todo su conocimiento.

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todos quienes forman parte de la facultad de odontología y laboratorio de microbiología de la USFQ, gracias a su apoyo y confianza estoy culminando una de las etapas más importantes de mi vida.

Resumen

La periodontitis apical refractaria es una lesión periapical persistente en los tejidos perirradiculares de una pieza dental tratada con endodoncia. El origen infeccioso de la persistencia de las lesiones periapicales es un tema controversial y desafiante en odontología. El punto de vista tradicional sobre este tema defiende la escasa presencia o ausencia de microorganismos en los tejidos. Sin embargo existe evidencia de la presencia de bacterias, levaduras y virus en dichas lesiones. El objetivo de esta investigación es realizar un estudio de casos y controles para comprobar la presencia de microorganismos viables en las lesiones y asociar esta presencia a la causalidad de las mismas. Utilizando microscopia y métodos moleculares se pudo comprobar la presencia de microorganismos en 16 o (80%) de 20 muestras de casos de lesión persistente (OR: 136, IC 95%: 14-317) y en 1 o (3%) de 35 muestras de tejido sano (OR:0.074, IC 95%: 0.0008-0.071), de esta manera asociando a los microorganismos identificados como un factor causal de la fisiopatología de la periodontitis apical refractaria.

Abstract

Refractory apical periodontitis is a periradicular infection which persists in periapical tissues even though root canal treatment is performed. . The infectious origin of persistent periradicular disease is controversial and an important challenge in dentistry. The traditional point of view regarding this theme defends that diseased tissues should be free from microorganisms or sparsely populated by them. However, there is evidence of presence of bacteria, viruses and fungi in periapical tissues of refractory cases. The aim of this investigation is to perform a case and control study to corroborate the presence of viable microorganisms and associate this presence as a causal factor. Through microscopy and molecular methods, this investigation was able to prove the presence of microorganisms in 16 or (80%) of 20 samples from refractory cases (OR: 136, IC 95%: 14-317) and in 1 or (3%) of 35 samples corresponding to the control group (OR: 0.074, IC 95%: 0.0008-0.071). The results obtained in this study can associate the identified microorganisms as a causal factor of persistent apical periodontitis.

Tabla de contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 HIPÓTESIS.....	14
3 OBJETIVOS.....	14
4 JUSTIFICACIÓN.....	15
5 MARCO TEÓRICO.....	16
5.1 Anatomía pulpar y perirradiculares.....	16
5.2 Patología pulpar.....	19
5.3 Periodontitis Periapical.....	20
5.3.1. Fisiopatología de la periodontitis periapical.....	21
5.3.2. Factores de expansión quística.....	23
5.4 Etiología de la enfermedad perirradicular persistente.....	25
5.4.1 Fracaso de la endodoncia.....	25
5.5. Cirugía Perirradicular.....	31
5.5.1. Manejo analgésico y antibiótico en la cirugía perirradicular.....	34
5.5.2. Principio de desinfección del campo quirúrgico.....	36
5.5.3. Anestesia Local para la cirugía.....	36
5.5.4. Consideraciones Anatómicas.....	37
5.5.5. Instrumental requerido para cirugía perirradicular.....	40
5.5.6. Acceso Quirúrgico.....	41
5.5.7. Definición y Clasificación de Colgajos.....	42
5.5.8. Acceso del tejido óseo.....	49
5.5.9. Raspado de la lesión Periapical.....	50
5.5.10. Técnica y manejo del ápice radicular.....	51
5.5.11. Sutura.....	54
5.6. Relación de la regeneración tisular guiada con la cirugía perirradicular.....	55
5.7. Complicaciones posoperatorias de la cirugía perirradicular.....	56
5.8. Principios Biológicos de regeneración y reparación.....	57
5.9. Microbiología de las lesiones periapicales refractariaal tratamiento endodóntico.....	64
5.10. <i>Candida albicans</i>	73
5.11. <i>Enterococcus faecalis</i>	74
5.12. Técnicas Moleculares para análisis microbiológico.....	76
5.12.1. Extracción de ADN.....	76
5.12.2. Amplificación de secuencias de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	79

5.12.3. Aplicación Microbiológica del 16 S.....	80
5.12.4. Electroforesis.....	81
5.12.5. Detección de ADN de células muertas por técnicas moleculares.....	83
5.13. Tinción Gram.....	83
6. METODOLOGÍA.....	85
6.1. Tipo de estudio:	85
6.2. Muestra:	85
6.2.1.Criterio de Inclusión de la muestra:	85
6.2.2.Criterio de Exclusión de la muestra	86
6.3. Materiales.....	88
6.4. Toma de muestras.....	89
7.RESULTADOS	100
8. DISCUSIONES	152
9. CONCLUSIONES.....	162
10. RECOMENDACIONES	164
11.Trabajos citados.....	165

Tabla de Figuras

Gráfico 1. Electroforesis b-Actina (297 pares de bases) muestras positivas en GC 3 4, 5, 6, 9 y en GE1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10	105
Gráfico 2. Beta-Actina Grupo control muestras positivas en GC 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34	105
Gráfico 3. B-actina grupo experimental, muestras positivas en GE 11, 12, 13, 14,15, 16, 17, 18, 19 y 20	105
Gráfico 4. B-actina muestras diluidas del grupo control, positivas GC 1, 2, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 30 y grupo experimental positivas GE 5, 3, 9, 12	106
Gráfico 5. Grupo control resultados negativos de muestras GC 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 para 16 s (1500 pares de bases)	106
Gráfico 6. Grupo control y experimental resultados positivos en muestras GE12, 14, 16,18, 19 y negativos en muestras GC12, 14, 16, 18 para el 16 s.....	106
Gráfico 7. Grupo experimental resultados positivos en muestras GE2, 3, 4, 5, 6, 9, 11 para 16 s.....	107
Gráfico 8. Grupo control muestra GC31 única positiva para 16 s y Grupo experimental muestras GE 1,2,3,4,9, 10, 11 positivas para 16 s.....	107
Gráfico 9. Grupo Control, resultados negativos de muestras GC1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 para 16 s	107
Gráfico 10. Grupo experimental: resultados positivos de muestras GE 5, 11, 12 y 16 para <i>Candida albicans</i> (158 pares de bases)	108

Gráfico 11. Grupo experimental: 4 muestras GE 5, 11, 12 y 16 positivas para <i>Candida albicans</i> y grupo control: muestras negativas GC1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 para el mismo gen	108
Gráfico 12. <i>Enterococcus faecalis</i> , #2 muestras positivas GE2 y GE9 (310 pares de base	108
Gráfico 13. Grupo Experimental: % Presencia Microorganismos Tinción Gram.....	144
Gráfico 14. Grupo Control: % Presencia Microorganismos Tinción Gram	144
Gráfico 15. Grupo Experimental: % Microorganismos identificados en tinción Gram...	145
Gráfico 16. PCR Grupo Control vs Grupo Experimental.....	146
Imagen.1,2.....	109
Imagen.3,4.....	110
Imagen.5,6.....	111
Imagen.7,8.....	112
Imagen.9,10.....	113
Imagen.11,12.....	114
Imagen.13,14.....	115
Imagen.15,16.....	116
Imagen.17,18.....	117
Imagen.19,20.....	118
Imagen.21,22.....	119
Imagen.23,24.....	120
Imagen26,27.....	121
Imagen.28,29.....	122
Imagen.30,31.....	123
Imagen.32,33.....	124
Imagen.35,36.....	125
Imagen.37,38.....	126
Imagen.39,40.....	127
Imagen.41,42.....	128
Imagen.43,44.....	129
Imagen.45,46.....	130
Imagen.47.....	131
Imagen.48,49.....	132
Imagen.50,51.....	133
Imagen.52,53.....	134

Imagen54,55.....	135
Imagen.56.....	136
Tabla 1. Principios de Colgajos quirúrgicos.....	42
Tabla 2. Microorganismos asociados a la periodontitis periapical refractaria	64
Tabla 3. Criterio Inclusión de la muestra	85
Tabla 4. Criterio Exclusión de la muestra	86
Tabla 5. Materiales de la Investigación	88
Tabla 6. División de la muestra	90
Tabla 7. Primers utilizados para identificar ADN de microorganismos seleccionados en el estudio.....	95
Tabla 8. Volumen y concentración utilizada para PCR beta-Actina.....	96
Tabla 9. Condiciones para PCR beta-Actina	96
Tabla 10. Volumen y concentración utilizada para PCR 16s.....	97
Tabla 11. Condiciones para PCR 16s	97
Tabla 12. Volumen y concentración utilizada para <i>Candida albicans</i>	98
Tabla 13. Condiciones para PCR <i>Candida albicans</i>	98
Tabla 14. Volumen y concentración utilizada para <i>Enterococcus faecalis</i>	99
Tabla 15. Condiciones para PCR <i>Enterococcus faecalis</i>	99
Tabla 16. Características del grupo Experimental #20 muestras (Tejido con lesión periapical).....	137
Tabla 17. Identificación de presencia de microorganismos del grupo Experimental en 1000 campos observados, #50 por cada muestra.....	138
Tabla 18.....	139
Tabla 19.....	140
Tabla 20.....	141
Tabla 21.....	143
Tabla 22.....	147
Tabla 23.....	148
Tabla 24.....	149
Tabla 25.....	150
Tabla 26.....	150
Tabla 27.....	151

1 INTRODUCCIÓN

La periodontitis periapical es una infección de alta prevalencia en el ser humano, los estudios indican que alrededor del 20% de casos con lesión periapical previa al tratamiento son persistentes o refractarios a la endodoncia. Esto señala que la presencia de periodontitis periapical antes de realizar la endodoncia es un factor de riesgo para el fracaso del tratamiento y la persistencia de la lesión. El proceso periapical empieza cuando la pulpa dental es invadida por microorganismos y consecuentemente se producen una serie de cambios fisiológicos y respuestas adaptativas en el cuerpo humano. Seguidamente a la respuesta inflamatoria causada por la invasión de microbiota, se forma tejido de granulación a nivel apical de la raíz que está infiltrado por neutrófilos, linfocitos y macrófagos los cuales actúan para combatir las bacterias causantes de la inflamación y posteriormente de la infección periapical. Cabe recalcar que la meta de una terapia endodóntica es eliminar todos los microorganismos que se encuentran dentro de los conductos radiculares, sin embargo en ciertos casos las lesiones refractarias se manifiestan y no ocurre la regeneración de los tejidos perirradiculares después de un tiempo considerable de haber tratado al diente. El fracaso de la terapia endodóntica convencional se atribuye a varios factores siendo uno de ellos la colonización de microorganismos en los tejidos periapicales, en el que estos microorganismos tienen la facultad de adaptarse de tal manera que se vuelven resistentes al tratamiento endodóntico, por lo que la lesión se hace persistente y no cede (Fouad, 2009). Sin embargo este es un tema de gran controversia en endodoncia ya que muchas teorías afirman que en la mayoría de casos los tejidos perirradiculares con lesión están libres de microorganismos y que por lo tanto la presencia de microbiota no debe ser considerada como uno de los principales factores causales de la persistencia de la lesión (Zuolo, M. et al, 2012). Es importante tomar en cuenta que al no

ceder la lesión periapical con el tratamiento endodóntico conservador se remite la pieza dental afectada a cirugía periapical el cual es el tratamiento indicado para eliminar el factor etiológico causante de la de la lesión refractaria (Saber, 2012). En el momento de realizar la cirugía perirradicular se puede tomar una muestra del tejido enfermo con el fin de realizar un análisis molecular y poder verificar la presencia y qué tipo de microorganismos son los causantes de la persistencia de la enfermedad. A pesar de que el punto de vista tradicional establece que los tejidos perirradiculares no deben estar invadidos por microorganismos, se ha reportado en investigaciones previas la presencia de virus, levaduras y bacterias principalmente anaerobias Gram positivas en este tipo de lesiones.

2 HIPÓTESIS

- ✓ Las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico que han sido resecaadas en cirugía perirradicular si van a mostrar presencia de microorganismos en los tejidos extraradicales al momento de realizar la tinción Gram y análisis molecular de ADN bacteriano, por el contrario los tejidos que no presenten lesión no tendrán presencia de microorganismos.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos Generales

- ✓ Comprobar la presencia e identificar el tipo de microorganismos en las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico que han sido resecaadas en cirugías perirradiculares realizadas de marzo a octubre del 2014 en Quito-Ecuador por medio de tinción Gram y análisis molecular de ADN bacteriano extraído de las muestras tomadas de tejido.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Comparar la frecuencia de colonización bacteriana en los tejidos periapicales entre pacientes con lesión y sin lesión periapical refractaria.
- ✓ Comprobar que la presencia de los microorganismos identificados es un factor causal para la persistencia de la lesión periapical refractaria.
- ✓ Comprobar que el ADN de los microorganismos identificados en las muestras es viable mediante la tinción Gram de las mismas.
- ✓ Comparar el índice y presencia de microorganismos entre pacientes sintomáticos y asintomáticos con lesión periapical refractaria.
- ✓ Comparar el índice y presencia de microorganismos entre pacientes con profilaxis antibiótica y antibiótico terapia de más de 24 horas.
- ✓ Identificar en los tejidos perirradiculares enfermos la presencia de microorganismos como *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* reportados según varios estudios como principales causantes del fracaso endodóntico.

4. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas en la actualidad demuestran que alrededor del 10% de tratamientos de endodoncia manejados correctamente y siguiendo los protocolos establecidos presentan lesiones periapicales refractarias. La evidencia sugiere que los microorganismos pueden colonizar los tejidos periapicales por su gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes y por lo mismo ser responsables de que la lesión periapical persista. Antes se creía que los microorganismos solo estaban presentes en los canales radiculares y que estos eran incapaces de invadir los tejidos periapicales,

pero en los últimos estudios se ha demostrado que al realizar un análisis molecular de los tejidos tomados de la lesiones se ha presentado un gran índice de microorganismos anaerobios y principalmente Gram positivos (Sunde, 2002).

Por medio de esta investigación será importante demostrar que ciertos microorganismos son causantes de la periodontitis apical refractaria y la identificación de ellos tendrá gran relevancia para el futuro tratamiento clínico y antibiótico de pacientes que presenten este tipo de lesiones.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Anatomía pulpar y perirradicular

Se conoce que la anatomía pulpar es de gran complejidad y por esto su tratamiento requiere precisión y minuciosidad. El sistema de conductos radiculares es aberrante y presenta diversas características como: varios forámenes apicales en un mismo diente, uniones entre conductos, deltas, asas, conductos en forma de C, conductos en furca y adicionales. Cada pieza dental tiene un sistema único de conductos radiculares por lo que cada diente se tratará de forma individualizada de acuerdo a la anatomía que presente (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

A nivel del ápice radicular existen varias partes anatómicas las cuales se han clasificado según Kutter de la siguiente manera (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

- **Constricción apical:** es la parte del conducto con el diámetro más pequeño en donde los vasos de la pulpa son estrechos y está situado de 0,5 mm a 1,5 mm del foramen apical.

- Unión cemento dentina: es la parte del conducto donde el cemento y la dentina se unen y donde termina el tejido pulpar para dar comienzo a los tejido periodontales. Este está ubicado a 1 mm del foramen apical.
- Foramen apical: se lo ve como un borde redondo que delimita la terminación del conducto cementario y la parte externa de la raíz.

La pulpa dental es un tejido blando que cumple diversas funciones, su función primaria es que en ella se encuentran y derivan los odontoblastos los cuales son los responsables de formar la dentina y son precursores de la formación del esmalte en las fases del desarrollo. Las otras funciones secundarias de la pulpa son la hidratación, defensa y sensibilidad dada a los dientes mediante el complejo vásculo-nervioso que la conforma. La pulpa dental está constituida por diferentes tipos de células que son los odontoblastos, células progenitoras y de defensa. La pulpa también está compuesta por elementos extracelulares que son las fibras de colágeno principalmente tipo I, fibroblastos, matriz no colagenosa y calcificaciones pulpares. Además de lo mencionado la pulpa posee vasos sanguíneos aferentes y eferentes, estos vasos son muy importantes en las etapas de inflamación de la pulpa en la que los vasos pasan por una fase de vasoconstricción y vasodilatación. En cuanto a la neuroanatomía de la pulpa esta contiene axones mielínicos y amielínicos, tiene un sistema nociceptivo y su inervación principal sensitiva viene de la segunda y tercera división del nervio trigémino (Torabinajed, 2010).

El periodonto se conoce como la estructura que rodea el diente y se compone de tres partes las cuales son: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Estos tejidos se forman del folículo dental que está alrededor del órgano del esmalte y su formación empieza cuando se desarrolla la raíz del diente. La pulpa dental se conecta con el

periodonto en las partes en las que los vasos sanguíneos de la pulpa salen por el foramen apical y se unen a la parte externa que es el periodonto (Torabinajed, 2010).

El cemento es un tejido de gran dureza que rodea toda la raíz del diente y donde se anclan las fibras periodontales. Puede clasificarse en (Torabinajed, 2010):

- Cemento fibroso intrínseco acelular primario
- Cemento fibroso extrínseco acelular primario
- Cemento fibroso intrínseco acelular secundario
- Cemento fibroso mixto celular secundario.
- Cemento fibrilar acelular.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, que posee un conjunto de fibras colágenas las cuales distribuyen las fuerzas del diente absorbiéndolas y dando soporte al diente dentro del alveolo. El espacio periodontal mide de 0,21 a 0,15 mm, éste posee cementoblastos y osteoblastos. Entre las fibras antes mencionadas existe un tejido conectivo laxo el cual está conformado por fibroblastos, células de defensa, vasos sanguíneos y tejido nervioso (Torabinajed, 2010).

El hueso alveolar por otro lado da soporte a los dientes, es decir reviste al alveolo y en él se anclan las fibras periodontales del LPD. Es de tipo laminar y su remodelación (reabsorción y aposición) depende de las fuerzas dentales ejercidas. Este tipo de hueso es más denso que el hueso esponjoso que lo rodea, aunque presenta agujeros para el paso de los nervios, vasos y tejidos conectivos de revestimiento. Cuando este hueso es continuo en una radiografía se puede decir que está saludable y cuando es irregular se puede detectar enfermedad (Torabinajed, 2010)

5.2. Patología pulpar

El acúmulo de biofilm bacteriano en la superficie de los dientes es un factor causal de la desmineralización de los mismos y consecuentemente la aparición de la caries. La caries tiene un origen multifactorial, sin embargo una mala higiene oral puede ser uno de los principales factores para la acumulación de biofilm en el medio oral y el desarrollo de la caries. La caries es un foco infeccioso en el medio oral que va a degenerar los tejidos con el tiempo, las bacterias que intervienen en la fisiopatología de la caries dental van a entrar en los túbulos dentinarios e irritar de esta manera los tejidos pulpares subyacentes. En ciertos casos la caries puede avanzar tanto que llegue a estar en íntimo contacto con la pulpa dental lo cual desencadenará diversas patologías pulpares como: pulpitis reversible, pulpitis irreversible y necrosis pulpar.

En primer lugar va a ocurrir una pulpitis reversible, es decir cuando la pulpa se inflama ya que responde a los mecanismos de defensa como los factores de complemento, las inmunoglobulinas y procesos de la inflamación que están actuando frente a la agresión bacteriana que penetra los túbulos dentinarios. Cuando la pulpa se ve afectada e inflamada por los agentes bacterianos se produce una pulpitis irreversible, esta condición provoca un gran dolor y precisa de tratamiento endodóntico. La inflamación empieza por la liberación de ciertos mediadores químicos los cuales van actuar en los vasos sanguíneos causando una vasoconstricción inicial para después provocar una vasodilatación. Durante la vasodilatación va hacerse más lento el flujo sanguíneo, se van acumular los hematíes en la parte central de los vasos y después va a ocurrir la emigración de los leucocitos a la parte periférica. El endotelio vascular consecuentemente va a presentar fisuras por las cuales va a ocurrir una “extravación plasmática” hacia el tejido conectivo. Esta extravación es la

causante del edema y aumento de presión en los tejidos provocará dolor por la compresión de las terminaciones nerviosas. Posteriormente a esta serie de cambios mediados por la inflamación, se producirá infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Cabe recalcar que en la fase aguda de la inflamación predominaran los PMN o polimorfonucleares los cuales enfrentaran a las agresiones bacterianas y productos metabólicos. Por otro lado en la fase crónica de la inflamación, ocurrirá la fase proliferativa la cual intenta regenerar los tejidos periapicales por medio de la formación de tejido de granulación. Es importante mencionar que en el caso de no ser tratada la afección pulpar a tiempo, la contaminación bacteriana avanzará en los tejidos pulpares hasta producir la necrosis de los tejidos es decir que estos ya no presentan su propiedades de vaascularidad e inervación y se ha producido muerte celular en ellos (Cohen, 2011).

5.3. Periodontitis apical

La periodontitis apical es una enfermedad de gran prevalencia en el ser humano, en un estudio epidemiológico realizado en América del Norte se presentó que en adultos de 20 a 30 años de edad la prevalencia de la enfermedad es del 33%, en adultos de 30 a 40 años la prevalencia es del 40%, en adultos de 40 a 50 años es del 48%, de 50 a 60 años es del 57% y de 60 años en adelante es del 62%. En 1990 se estimó que en Estados Unidos se hicieron 14 millones de tratamientos de conducto debido a esta enfermedad por lo que se puede considerar prevalente y de importancia en el ser humano (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

La etiología de la periodontitis apical puede ser provocada por factores exógenos y endógenos. Los factores exógenos son: bacterias, toxinas, traumatismos y cuerpos

extraños, mientras que los factores endógenos son los productos metabólicos del huésped como los cristales de colesterol y uratos que activan la función de los osteoclastos. Estos factores son los que inician “la respuesta inmuno-inflamatoria innata y adaptativa” (Cohen, 2011).

5.3.1. Fisiopatología de la periodontitis periapical

La fisiopatología de las lesiones periapicales comienza a partir de la afección de la pulpa dentaria por diversos factores que pueden ser una caries, trauma u otra condición del paciente como el bruxismo que puede alterar la vitalidad de la pulpa dentaria provocando su necrosis. Por lo general, la invasión de la pulpa se da por los microorganismos presentes en la cavidad oral los cuales provocan previamente la caries en la pieza dentaria. Una vez que la pulpa se encuentra invadida por los microorganismos de la flora oral normal, se generan varios fenómenos inflamatorios como el aumento de la permeabilidad capilar y flujo sanguíneo pulpar. La pulpa dentaria está rodeada por dentina la cual no es distensible, por lo que consecuentemente se incrementa la presión tisular del tejido pulpar y continua la colonización bacteriana en el tejido necrótico. En respuesta a todos estos fenómenos que ocurren en la pulpa afectada, se da la respuesta inmunitaria del paciente para defenderse del proceso infeccioso. La respuesta inmunitaria será celular y humoral, para primeramente frenar la propagación de la infección en los tejidos pulpares y posteriormente en los tejidos periapicales. Cuando el proceso inflamatorio se extiende hacia el ápice y tejidos perirradiculares, se desarrollan mecanismos de defensa inmunológicos en los que las interleucinas, factores que activan los leucocitos y el factor de necrosis tumoral actúan como mediadores que activan a los osteoclastos y macrófagos. La activación de estas células provocará consecuentemente la osteolisis de los tejidos que rodean a la pieza dentaria afectada y rizólisis de la misma. Adicionalmente, la necrosis pulpar genera

detritos celulares, fibrina, anticuerpos y células inflamatorias que se liberaran hacia los tejidos periapicales, lo cual inicialmente podrá ser contrarrestado por los mecanismos inmunitarios del paciente. Sin embargo cuando la proliferación de microorganismos es mayor e incrementa la producción de detritos, el sistema inmunológico del paciente delimita el proceso infeccioso formando un granuloma primario que localiza la agresión. No obstante si la virulencia, patogenicidad y cantidad de detritos producidos en la pulpa necrótica sobrepasa los mecanismos de defensa inmunológicos, se desarrollará un absceso periapical agudo el cual requiere de drenaje en la mayoría de casos acompañado de terapia antibiótica (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

El granuloma primario antes mencionado puede desarrollarse y convertirse en diferentes entidades patológicas como un quiste periapical, que se forma principalmente a partir de la proliferación de los restos embrionarios epiteliales de Malassez localizados en el periodonto radicular. Un quiste periapical es definido por Sapp como un “Quiste odontógeno de origen inflamatorio derivado de los restos de Malassez, los cuales proliferan en respuesta a la inflamación” de una infección bacteriana en la pulpa necrótica. (J. Sapp, L. Eversole, G. Wysocki, 2005). Este tipo de quiste está cubierto por epitelio estratificado escamoso, su cavidad está revestida de epitelio plano no queratinizado, contiene neutrófilos en su revestimiento epitelial y posee un infiltrado con histocitos, linfocitos y células plasmáticas. Cuando ocurre una “sobre infección” del quiste formado por la propagación de microorganismos, se puede provocar un absceso periapical agudo o generar una reacción inmunológica hacia el cuerpo extraño lo cual dará como consecuencia la formación de un granuloma secundario (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Existen diferentes fases de crecimiento de los quistes, estas se dividen en: fase inicial en la cual se lleva a cabo la proliferación de los restos epiteliales de Malassez. Estos

son estimulados por la respuesta inflamatoria. Después comienza la fase de formación del quiste en la que se forma una cavidad con recubrimiento epitelial por medio de la muerte celular y degeneración de los epitelios. Continúa a esta fase la de crecimiento del quiste, en la cual ocurren cambios en la presión osmótica provocando que existan diferencias entre la presión interna hidrostática de 70 mm en la cavidad (quiste) y la presión osmótica sanguínea capilar exterior que es menor. Simultáneamente ocurre la reabsorción ósea en los tejidos que rodean la cavidad lo cual está mediado por las prostaglandinas y la destrucción del tejido conectivo adyacente que está inducida por las colagenasas. De esta forma los quistes crecen lentamente expandiéndose ya que la presión intersticial aumenta en su interior y al expandirse se da la reabsorción ósea en la periferia. Los quistes contienen un fluido mucopurulento compuesto de proteínas séricas, inmunoglobulinas, cristales de colesterol, glucosaminoglicanos y otras proteínas plasmáticas. Otro factor importante en el progreso de la lesión es el tipo de bacterias presentes en la misma, ya que ciertas bacterias poseen factores de virulencia con efectos citotóxicos capaces de liberar enzimas y acelerar este proceso (Leyva, E., Tapia, J., Quezada, D. Ortiz, E., 2006).

5.3.2. Factores de expansión quística:

Entre los mecanismos de expansión quística, esta primero la proliferación epitelial en la que el factor de crecimiento KFG que es producido por los fibroblastos estromales, estimula el crecimiento y proliferación epitelial de los restos de Malassez, cambia el pH y la tensión del CO₂. El siguiente factor de expansión quística es la acumulación de contenidos celulares en el que se establece una teoría que dicta que un quiste incrementa su volumen por el acúmulo de queratina, células y líquido dentro de la cavidad lo cual aumenta la presión osmótica dentro del quiste y con eso produce la entrada de líquido en el como resultado de la osmosis y diferencia entre los gradientes de concentración internos y

externos. Aparte de lo mencionado, se ha reportado que la interleucina-6 encontrada en el líquido interno de los quistes es importante para el crecimiento y expansión también. Otro factor de expansión quística es el crecimiento hidrostático, el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF que es una citosina que aumenta la permeabilidad vascular y produce la angiogénesis con lo que se acumulan células inflamatorias en la luz del quiste por lo que después se producirá la entrada de líquido al quiste debido a la osmolaridad de los fluidos y la búsqueda del equilibrio entre ellos. El factor de reabsorción ósea es otro mecanismo de crecimiento del quiste, en este varias interleucinas principalmente la IL-1, el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral aumentan la actividad de los osteoclastos lo cual aumenta la reabsorción ósea alrededor del sitio de la lesión y como resultado el quiste se puede expandir en los tejidos. Las prostaglandinas, leucotrienos y colagenasas también producen reabsorción de los tejidos perirradiculares. Se conoce que la IL-1 “es la citosina más activa que actúa en las expansión quística a través de su acción en un amplio espectro de funciones celulares como proliferación de fibroblastos, producción de prostaglandinas en la cápsula quística y osteólisis” (Leyva, E., Tapia, J., Quezada, D. Ortiz, E., 2006). Otro factor importante es la actividad enzimática dentro del quiste la cual favorece al crecimiento del mismo. Además de lo mencionado, también aumenta el número de células cebadas en el quiste, con esto incrementa el contenido de ácido hialurónico haciendo el pH más ácido e induciendo la entrada de mayor líquido dentro del quiste. El último mecanismo de expansión quística es la reacción de defensa del huésped, al defenderse de las endotoxinas bacterianas libera mediadores inflamatorios lo cual produce un incremento del AMPc que estimula a los restos epiteliales induciendo el crecimiento quístico también (Oliveira, R., Carvalho, B., Soares, L. , 2004).

5.4. Etiología de la enfermedad perirradicular persistente

5.4.1. Fracaso de Endodoncia con conductos tratados adecuadamente

El éxito del tratamiento endodóntico ha demostrado ser muy alto, las investigaciones señalan que tiene un índice de éxito del 90 a 95% en piezas dentales sin lesión periapical, sin embargo este índice baja considerablemente cuando el tratamiento fue efectuado en una pieza con lesión periapical previa, siendo el índice de éxito en estos caso del 75 al 80%. Esto indica que alrededor de 2 de cada 10 dientes con lesión periapical previa al tratamiento no van a responder a la endodoncia convencional (Fouad, 2009).

El fracaso del tratamiento endodóntico es un tema muy investigado y discutido en la endodoncia, en algunos casos a pesar de que se realiza el tratamiento endóntico bajo los mayores cuidados persiste la lesión periapical lo cual se conoce como “periodontitis apical refractaria”. En estas situaciones los métodos conservadores de instrumentación e irrigación endodónticos quedan debilitados y sin posibilidades frente al “fracaso” del tratamiento. Han surgido diversas teorías sobre las razones por las que el tratamiento endodóntico no funcionó y en la mayoría de ellas la solución propuesta para lograr el éxito del tratamiento tiene que dejar de ser conservadora y pasar a ser invasiva para poder eliminar el agente causal de la persistencia de la enfermedad.

La persistencia de la periodontitis periapical después del tratamiento endodóntico se puede dar por diversos factores, la principal causa es asociada a la proliferación microbiana en los conductos radiculares ya que por su anatomía aberrante es posible que ciertas zonas no puedan ser alcanzadas por la conformación e irrigación durante la instrumentación de los conductos. Por lo antes mencionado, una de las principales causas del fracaso de la endodoncia es la presencia de microorganismos en los conductos radiculares después de

ser tratado el diente. Muchas veces se puede intentar un segundo tratamiento endodóntico es decir un retratamiento con el fin de eliminar el contenido microbiano de los conductos, sin embargo los microorganismos pueden persistir en los conductos radiculares aún en tratamiento endodónticos realizados con todas las medidas y protocolos adecuados. Esto puede ocurrir porque la endodoncia convencional tiene limitaciones de acceso a ciertas partes de los conductos radiculares como los deltas apicales, ramificaciones, istmos y ciertos túbulos dentinarios los cuales pueden albergar microorganismos. Consecuentemente la enfermedad perirradicular puede persistir si los microorganismos que sobreviven las condiciones adversas de los conductos radiculares obturados tienen capacidad y patogenicidad suficiente para acceder a los tejidos circundantes de la pieza dental e invadirlos aunque la disponibilidad de nutrientes sea escasa. El fracaso endodóntico se relacionaba a la presencia de uno o dos microorganismos causales de la enfermedad los cuales se detectaban mediante cultivos, sin embargo las técnicas moleculares avanzadas de hibridación de ADN demuestran la presencia de “filiotipos múltiples” de bacterias tanto dentro de los conductos como en los tejidos periapicales, los cuales en el pasado no pudieron ser cultivados (Zuolo, M. et al, 2012). Por lo mencionado anteriormente, se ha establecido según diversas investigaciones que la periodontitis apical persistente es de origen polimicrobiano. Adicionalmente, es relevante recalcar que la presencia de hongos y virus en los conductos radiculares también es considerada un factor causal de importancia en los fracasos endodónticos (Cohen, 2009). Entre los virus encontrados en los tejidos perirradiculares se ha detectado el Epstein-Barr (EPV) y el citomegalovirus (HCMV) (Zuolo, M. et al, 2012).

Además de lo mencionado, vale la pena resaltar que el biofilm bacteriano tiene un papel importante en el fracaso endodóntico. El biofilm que se define como “una

comunidad microbiana inmóvil caracterizada por células adheridas a un sustrato orgánico o inorgánico, embebida en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares “ (Zuolo, M. et al, 2012) puede estar formado tanto dentro de los conductos radiculares como en la superficie externa radicular de las piezas tratadas endodónticamente siendo uno de los factores principales que se asocian al fracaso del tratamiento y persistencia de la lesión perirradicular. Estas colonias de microorganismos organizadas que componen el biofilm son más resistentes a la respuesta de defensa del huésped y a los antimicrobianos ya que se forma una biopelícula protectora sobre las colonias bacterianas que es un gel polisacárido hidratado que no permite que las líneas de defensa del sistema inmune como los anticuerpos, complementos y las células fagocitarias puedan acceder a la zona colonizada por los microorganismos. Esta biopelícula limita de una manera semejante el acceso de los compuestos antimicrobianos (Zuolo, M. et al, 2012).

Existe una gran controversia y diversas teorías que se enfrentan en cuanto a la presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares. La presencia bacteriana en los tejidos circundantes a la raíz de la pieza dental afectada es sin duda uno de los temas más polémicos en endodoncia (Zuolo, M. et al, 2012). En la actualidad varios estudios realizados con técnicas avanzadas de biología molecular han confirmado la presencia microbiana en los tejidos perirradiculares, sin embargo muchos estudios son cuestionados por sus técnicas, selección de casos y contaminación de muestras (Sunde, 2002).

Citando a Zuolo et al. , se establece que la “presencia de bacterias en lesiones apicales crónicas y asintomáticas es todavía uno de los temas más polémicos en endodoncia.” (Zuolo, M. et al, 2012). Adicionalmente, Cohen en *Vías de la pulpa*, menciona que en la actualidad hay controversia sobre la presencia de colonias bacterianas extrarradiculares a pesar de que algunas investigaciones lo comprueban (Cohen, S. &

Burns, R., 2011). Muchos autores todavía convalidan el concepto antiguo sobre que un granuloma es un lugar donde las bacterias son destruidas y eliminadas por lo que no pueden vivir ni fijarse en el mismo. Un granuloma desde el mismo punto de vista es una reacción del sistema inmunológico para evitar la propagación de la infección a los tejidos perirradiculares de la pieza dental infectada (Fouad, 2009). A pesar de que esta teoría es sostenida por muchos profesionales en la actualidad, como ya se mencionó anteriormente las últimas investigaciones que han realizado técnicas moleculares de hibridación de ADN han confirmado la presencia de microorganismos en los tejidos que rodean al diente en casos de enfermedad periapical refractaria. A pesar de que las investigaciones confirman la presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares, se ha cuestionado estas por deficiencias en la realización de los protocolos durante los procesos investigativos. Entre los cuestionamientos y deficiencias destacadas de estos estudios están: la recolección de muestras sin ningún cuidado previo para evitar la contaminación de la muestra con las bacterias presentes en el medio oral, la selección inadecuada de los casos en los que se incluyen pacientes con fistulas o fracturas radiculares y las limitaciones de los análisis de ADN bacteriano los cuales no puede establecer si el ADN identificado pertenece a microorganismos viables o muertos. Por lo anteriormente expuesto, Nair en su artículo “On the causes of persistent apical periodontitis: a review” (2006) expone su posición en que los tejidos perirradiculares de casos asintomáticos no son invadidos por microorganismos en la mayoría de los casos y que estos solo pueden hacerlo en las siguientes situaciones (Zuolo, M. et al, 2012):

- Infección provocada por *Actinomyces* y *Propionibacterium* ya que estas bacterias tienen la habilidad de colonizar los tejidos periapicales y establecerse extrarradicularmente (Nair, 2006).

- Por restos de dentina o materiales que estén contaminados y se transporten a la región apical durante el tratamiento endodóntico (Nair, 2006).
- Por la presencia de quistes que tengan comunicación abierta con el interior de los conductos contaminados (Nair, 2006).
- Por agudizaciones de las lesiones crónicas en las que se da paso a un absceso dentoalveolar-agudo (Nair, 2006).
- Por el acceso de bacterias a los tejidos perirradiculares por medio de bolsas periodontales, fístulas y fractura (Nair, 2006) .

Siendo la presencia microbiana uno de los factores más importantes por los que el tratamiento endodóntico fracasa, existen otros factores causales descritos en la literatura que es la formación de quistes periapicales. En la mayoría de los casos se espera que después del tratamiento endodóntico convencional los quistes evolucionen hacia la reparación. Sin embargo en el caso de que se forme un quiste verdadero, el cual es una lesión quística definida y rodeada por una capa epitelial que separa al quiste por completo de la raíz dental, se puede dar que el quiste continúe expandiéndose a pesar de estar tratada la pieza dental con endodoncia. Estos quistes son independientes del estado de los conductos radiculares, por lo que es necesaria la intervención quirúrgica para extirparlos (Zuolo, M. et al, 2012).

Otra causa de fracaso del tratamiento de endodoncia no quirúrgico puede ocurrir cuando las células de defensa desprenden moléculas de colesterol durante el proceso de desintegración en los tejidos perirradiculares. En este proceso se provoca la lisis de las membranas plasmáticas de los plasmocitos, leucocitos, linfocitos y lípidos del plasma por lo que los cristales de colesterol pueden depositarse y precipitarse en los tejidos perirradiculares. La acumulación de estos cristales impide a las células gigantes de defensa

y macrófagos degradarlos por lo que se retrasa consecuentemente la reparación de los tejidos perirradiculares (Zuolo, M. et al, 2012).

Finalmente las causas extrínsecas también son las responsables del fracaso endodóntico, entre estas están la extrusión en sentido apical de materiales de obturación, restos alimenticios y otros componentes de algodón, papel o gasas a los tejidos periapicales. Los materiales extruidos a los tejidos son considerados por el sistema de defensa como cuerpos extraños por lo que es probable que se mantenga la lesión periapical impidiendo la reparación y en muchos casos se intensifique la respuesta tecidual inflamatoria con la presencia de células gigantes y macrófagos (Zuolo, M. et al, 2012).

El periodo de regeneración de los tejidos es un factor importante a tomar en cuenta para valorar el fracaso o éxito del tratamiento endodóntico. Por lo general la literatura ha establecido que se debe esperar un periodo de 12 meses después del tratamiento para poder verificar mediante controles radiográficos si la lesión está disminuyendo en tamaño y consecuentemente si el tratamiento está funcionando. En el caso de que esté ocurriendo la regeneración de tejidos, se llevará a cabo una migración y diferenciación celular hacia la zona del defecto a fin de restablecer los tejidos perdidos por la enfermedad, sin embargo la restauración de los tejidos se puede observar en las radiografías como zonas radiolúcidas. Al desarrollarse diferentes tipos de reparación, no siempre se consigue una regeneración de la estructura original de los tejidos por lo que se forma tejido de cicatrización que se ve radiográficamente como lesiones radiolúcidas de tamaño menor con cierta malformación ósea. Es esencial distinguir el tejido de cicatrización postratamiento endodóntico para no confundirlo con la persistencia de la lesión periapical. Para poder determinar el éxito o fracaso de la endodoncia y establecer la persistencia de la lesión se han establecido los siguientes criterios tanto para casos sintomáticos como asintomáticos (Zuolo, M. et al,

2012):

- Valorar la presencia de signos y síntomas de la inflamación como edema, fístula y dolor los cuales indican el fracaso del tratamiento.
- Reparación completa de la lesión periapical después de un año del tratamiento es considerado éxito en pacientes asintomáticos.
- Reparación incompleta de la lesión en el que se observe tejido de cicatrización después de un año del tratamiento se considera también éxito en pacientes asintomáticos.
- Una reparación de los tejidos incierta hasta después de cuatro años de realizado el tratamiento endodóntico en pacientes asintomáticos se considera como posible fracaso y de acuerdo al criterio clínico se debe realizar la reintervención ya sea conservadora o quirúrgica.
- La presencia de una reparación insatisfactoria después de un año del tratamiento en la que la lesión no haya disminuido de dimensión y se haya mantenido de igual o mayor tamaño en pacientes asintomáticos se considera el fracaso del tratamiento endodóntico y la indicación de una intervención.

5.5. Cirugía Perirradicular

A pesar de que el tratamiento endodóntico convencional es una opción de tratamiento para afecciones pulpares y periapicales con gran índice de éxito, existen diversos motivos por los que el tratamiento convencional endodóntico puede fallar y dar paso a una lesión periapical refractaria. En casos en los que los tejidos perirradiculares no respondan al tratamiento endodóntico conservador, se debe dar paso a la cirugía perirradicular la cual tiene como intención eliminar la etiología de la persistencia de la enfermedad periapical

(Cohen, 2012). Sin duda alguna la cirugía perirradicular es una extensión y complemento preciso del tratamiento no quirúrgico endodóntico ya que los dos procedimientos tienen como objetivo principal la prevención o eliminación de la periodontitis periapical (Cohen, 2011).

Raspall establece que esta cirugía se compone “de un conjunto de técnicas quirúrgicas cuyo objetivo es el abordaje de las raíces de los dientes y de los tejidos adyacentes, la remoción y biopsia de tejidos patológicos a este nivel y la realización de procedimientos terapéuticos en el ápice de la raíz dentaria” como el sellado retrógrado del conducto. Consecuentemente el principal objetivo de la cirugía es eliminar el agente causal de la persistencia de la enfermedad y de esta manera complementar la endodoncia convencional (Raspall, 2006).

Es importante recalcar que las lesiones periapicales refractarias se diagnostican principalmente por medio radiográfico, las radiografías presentan por lo general una zona radiolúcida alrededor de las raíces de la pieza afectada. Para que un defecto se pueda observar en una radiografía debe haber por lo menos una pérdida ósea del 30 al 60%. La sombra radiolúcida puede tener varias interpretaciones por lo que la clínica y radiografía serán herramientas para establecer un diagnóstico presuntivo. Posterior a la extirpación de la lesión periapical se podrá confirmar el diagnóstico por medio de un estudio histopatológico del mismo (Raspall, 2006).

En general el tratamiento endodóntico quirúrgico está indicado principalmente en lesiones periapicales refractarias que se presentan en dientes con postes radiculares largos, en dientes con instrumentos fracturados, en dientes con conductos bloqueados o desplazados, en dientes tratados con materiales previos de obturación duros, en dientes en los que ha fallado el retratamiento previo, en dientes en los cuales se haya sobre obturado o

desplazado material hacia los tejido periapicales, en dientes con fractura vertical y en piezas en los que se sugiera realizar una biopsia de los tejidos perirradiculares. Cabe recalcar que se ha establecido según Cohen que el “pronóstico del tratamiento quirúrgico es aproximadamente igual que el del tratamiento no quirúrgico” (Cohen, S. & Burns, R., 2011). Sin duda el pronóstico de la cirugía periapical también dependerá de diversos factores clínicos como la edad del paciente, enfermedades sistémicas que posea el paciente, la zona que este afectada en la cavidad oral, el tipo de hueso involucrado, el soporte periodontal de la pieza dental afectada, la cantidad de tejido dentario residual, resistencia de la pieza dental a la fractura, entre otras variables (Cohen, S. & Burns, R., 2011)).

5.5.1. Indicaciones específicas de cirugía periapical según Raspall (2006):

- Si existen muchas posibilidades de fracaso con un tratamiento no quirúrgico exclusivamente:
 - a) Cercanía del ápice con el seno maxilar y canal dentario
 - b) Dientes con falsas vías o perforaciones
 - c) Pacientes que no puedan ser controlados y asistir a revisiones regulares
- Imposibilidad de tratamiento endodóntico no quirúrgico
 - a) Ápices con curvaturas marcadas o calcificadas
 - b) Conducto radicular al cual no hay como acceder por postes, pernos, calcificación e impactación de materiales obturadores.
- Fracazos de endodoncia no quirúrgica previa
 - a) Sintomatología clínica persistente de la pieza tratada
 - b) Persistencia de drenaje a través del canal

- c) Fractura de instrumento
 - d) Sobre obturación del conducto lo cual puede exacerbar la lesión periapical.
 - e) Piezas dentales tratadas correctamente pero que demuestran en los controles radiográficos aumento progresivo de la dimensión de la lesión perirradicular.
- Confirmación de una biopsia

5.5.1. Manejo analgésico y antibiótico en la cirugía perirradicular

Los estudios han reportado que suministrar un AINE al paciente media hora antes o después de la intervención quirúrgica es de gran ayuda para disminuir los síntomas de dolor. En comparación al placebo y utilización de paracetamol se ha establecido en varios estudios que los AINES son más eficaces para el dolor postoperatorio. Adicionalmente a la administración de un AINE antes de la cirugía se puede infiltrar la zona intervenida con un anestésico local de larga duración con el fin de reducir el dolor después de la intervención (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Durante esta cirugía es probable que ocurra una bacterteriemia transitoria, por lo que es indicado que los pacientes que tengan factores de riesgo para desarrollar una endocarditis bacteriana reciban profilaxis antibiótica. La AHA o American Health Association establece que ya no se debe indicar profilaxis antibiótica en pacientes que presenten (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

- Cardiopatía reumática
- Antecedentes de prolapso de la válvula mitral

- Estenosis aórtica
- Cardiopatías congénitas
- Enfermedad valvular bicuspídea

Por lo que solo se recomienda la profilaxis antibiótica para tratamientos odontológicos que involucren la manipulación de los tejidos periapicales, gingivales y de la mucosa oral en pacientes que pertenezcan al grupo de mayor riesgo. Es decir en pacientes que presenten una valvulopatía la cual tiene riesgo de desarrollar una endocarditis infecciosa, también en pacientes que porten una válvula cardíaca, pacientes que tengan antecedentes de endocarditis infecciosa y pacientes que presenten historial de abuso de drogas por medio intravenoso. En el caso de los pacientes con una prótesis articular, se debe hacer interconsulta con el cirujano ortopédico ya que pueden tener mayor posibilidad de desarrollar una infección “articular hematógena” después de la cirugía oral (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

En el caso específico de la cirugía perirradicular, no se indica el uso de profilaxis antibiótica de rutina. Se considera que el uso inadecuado de los antibióticos puede traer más desventajas que beneficios para el paciente (Torabinajed, M. & Machnick, T.K, 2005). En general, la cirugía oral menor en pacientes sin enfermedad tiene una incidencia de infección bastante baja. Un estudio demostró que en pacientes sin ninguna alteración sistémica significativa, el porcentaje de infección pos-extracción de terceros molares fue de tan solo el 1% (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

En el tema de los pacientes comprometidos sistémicamente es diferente la indicación de profilaxis antibiótica, por ejemplo se debe indicar en pacientes que sean inmunodeprimidos o que sufran de diabetes la cual es una condición que altera y retrasa la curación de los tejidos perirradiculares tanto en tratamientos conservadores como invasivos

que es el caso de la cirugía periapical (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.5.2. Principio de desinfección del campo quirúrgico

La cirugía perirradicular indica el uso de gluconato de clorhexidina al 0,12% para disminuir el número de microorganismos en el medio oral y principalmente en la zona que será intervenida (Sunde, 2002). El gluconato de clorhexidina se debe utilizar como colutorio oral antes de la incisión y elevación del colgajo con el objetivo principal de reducir el riesgo de infección posquirúrgica. Se ha reportado también el uso de este colutorio después de la cirugía para disminuir la carga bacteriana en la sutura y bordes de la herida, sin embargo podría afectar el proceso de curación de la herida a nivel de la reinsertación de los fibroblasto (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.5.3. Anestesia Local para la cirugía

La técnica anestésica dependerá de la pieza dental que será sometida a cirugía y su localización, por lo general se debe realizar un bloqueo regional e infiltración local con el objetivo de lograr una anestesia local profunda y hemostasia para mejorar la visibilidad del área quirúrgica. Para la hemostasia se recomienda el uso de anestésico con vasoconstrictor, con adrenalina 1:50.000 o 1:100,000. Se debe colocar el anestésico con vasoconstrictor de manera cuidadosa y lenta en el área vestibular correspondiente a la mucosa alveolar del ápice la raíz y también en las zonas adyacentes a esta área que es de tres dientes a cada lado. Después de infiltrar el área vestibular es necesario hacerlo por palatino a este nivel, sin embargo la cantidad de anestésico depositado será menor. Una vez colocado el anestésico se espera por lo menos 10 diez minutos para lograr un efecto anestésico y de vasoconstricción en la zona que será intervenida. Después de los diez minutos transcurridos se puede hacer prueba en los tejidos con un instrumento afilado para

verificar el efecto anestésico en los tejidos. Una vez concluida la cirugía se puede infiltrar el área con un anestésico de acción prolongada para reducir el dolor después de la cirugía (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.5.6. Consideraciones Anatómicas para la cirugía perirradicular

Es de extrema importancia planificar el acceso quirúrgico de manera que se preserven todas las estructuras anatómicas cercanas. En el caso de la cirugía periapical, se debe tomar en cuenta la posición de la pieza a tratar con las estructuras anatómicas relevantes ya que esto dictaminará si la cirugía es viable. Diferentes parámetros anatómicos pueden dificultar esta cirugía como un hueso vestibular denso y ancho, músculos faciales muy activos, cercanía de la lesión al seno maxilar, un vestíbulo poco profundo, entre otros (Signoretti, F. et al, 2011).

En la cirugía perirradicular, la región mandibular posterior es muy importante ya que se debe tomar en cuenta al paquete vasculo-nervioso que sigue el trayecto por el conducto mandibular y sale por el agujero mentoniano a fin de no lesionarlo durante la incisión o levantamiento del colgajo. El conducto mandibular se puede visualizar en radiografías, sin embargo ciertas veces no se puede observar y se debe precautelar no lesionar el paquete vasculonervioso al realizar el acceso quirúrgico entre los ápices radiculares de las piezas posteriores mandibulares y el borde superior del canal mandibular. Un estudio establece que la distancia promedio entre el ápice de la raíz distal del segundo molar inferior y el borde superior del conducto mandibular es de 3,5 mm, la cual incrementa en distancia a medida que las piezas se acercan a la línea media. Aparte de lo mencionado generalmente el hueso a nivel radicular del segundo molar inferior es más

grueso y sus raíces se inclinan hacia lingual por lo que tanto por su cercanía al canal mandibular, posición de las raíces y característica de hueso es compleja la realización de esta cirugía en los segundos molares inferiores y se debe valorar siempre el riesgo versus el beneficio de la intervención mencionando al paciente todos los tratamientos alternativos que se pueden realizar (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

El agujero mentoniano se encuentra entre los dos premolares inferiores a nivel de sus ápices y por esta cercanía es una de las mayores dificultades que se presentan al realizar la cirugía perirradicular de estas piezas ya que se requiere de una técnica quirúrgica muy minuciosa para no lesionar esta estructura anatómica. El agujero mentoniano debe ser observado previamente en una radiografía panorámica y periapical para realizar cualquier intervención cercana a esta zona (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010). Adicionalmente, a fin de no lesionar el paquete vasculo-nervioso que se encuentra en el agujero mentoniano se puede realizar diferentes técnicas quirúrgicas para acceder a los ápices de los premolares inferiores sin realizar la incisión cercana al agujero, por ejemplo se puede realizar la incisión distal de descarga vertical entre el primer y segundo molar inferior para tener acceso al ápice de los premolares y de esta manera preservar la integridad de este agujero y sus estructuras anatómicas asociadas. Al realizar la incisión y desbridamiento del colgajo también es esencial tener cuidado de tocar la arteria facial la cual se encuentra inferior al fondo de saco del vestíbulo justamente a nivel del primer molar inferior (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Otro factor de importancia es la profundidad del vestíbulo, por ejemplo un fondo de saco del vestíbulo que no sea profundo es señal de que el hueso alveolar subyacente es de mayor grosor y por lo tanto el acceso quirúrgico al ápice será más complejo (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

En la región posterior del maxilar, se debe considerar principalmente la proximidad de los ápices que deben ser tratados con el seno maxilar. La distancia entre los ápices radiculares de los molares superiores y la membrana del seno maxilar es de alrededor de 1mm. Por esta cercanía al realizar la apicectomía de las piezas maxilares superiores, un estudio reportó que la perforación de la membrana que recubre al seno maxilar tiene una incidencia del 10 al 50% (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010). Afortunadamente la membrana sinusal suele regenerarse sin repercutir perjudicialmente en el paciente, sin embargo la curación y proceso de maduración del tejido óseo tiende retardarse. Se puede tener efectos secundarios si tejido contaminado del ápice o la lesión entra en la cavidad del seno maxilar al ser expuesta, pudiendo provocar posteriormente una infección o sinusitis de origen ontogénico. Por lo anteriormente mencionado se debe tener especial cuidado en no dejar que ningún resto de raíz o tejido entre en el seno maxilar y también realizar las descargas verticales para el acceso quirúrgico por lo menos a una distancia de un diente distal y uno mesial de la pieza afectada para que en el caso de que ocurra la perforación de la membrana del seno maxilar se pueda realizar un colgajo mucoperióstico que permita el cierre de la zona expuesta y consecuentemente una regeneración adecuada. Además, se debe realizar la apicectomía de manera que el ápice se pueda extraer como un solo cuerpo y no en pequeños pedazos que puedan contaminar la cavidad (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Sin duda las raíces palatinas de los molares superiores también son un desafío en la cirugía perirradicular, no está contraindicada la cirugía periapical de estas piezas no obstante se debe valorar si los beneficios de la cirugía justifican su ejecución. Se puede realizar el acceso quirúrgico por vía vestibular o palatina, en la técnica realizada por medio de una incisión vestibular puede haber la necesidad de reseca los ápices las raíces

vestibulares para llegar a la palatina. Nuevas técnicas describen el uso del microscopio quirúrgico dental el cual ayuda a tener una mayor visibilidad e iluminación durante el procedimiento, logrando así un mejor acceso quirúrgico a las raíces afectadas. Se puede realizar también un abordaje palatino el cual dificulta la técnica y proporciona poca visibilidad del área intervenida, en el caso de un paladar profundo se puede favorecer la técnica por presentar menor grosor de hueso pero en caso de un paladar no profundo con mayor grosor óseo será aún más difícil llegar al ápice afectado (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010).

En el área anterior del maxilar y mandíbula la técnica se simplifica, ya que hay menos complicaciones y riesgos de lesionar las estructuras anatómicas importantes. Las complicaciones principales que pueden darse en los dientes anteriores son en piezas que tengan raíces muy largas, inclinación radicular hacia lingual y fondo de saco vestibular poco profundo (Signoretti, F. et al, 2011).

5.5.7. Instrumental requerido para cirugía perirradicular

- Carpul
- Mango de bisturí
- Hoja de bisturí #15
- Legra
- Periostótomo
- Separador de tejidos
- Tijera de tejidos
- Tijera de material
- Pinza quirúrgica
- Pinza adson

- Pinza de tejidos y microtisular
- Espejo bucal
- Sonda periodontal
- Instrumental para retrobturación del ápice
 - Espátula de cemento
 - Obturador
 - Microbruñidor
- Succión quirúrgica
- Pinza porta agujas
- Sutura

5.5.8. Acceso quirúrgico

Los objetivos más importantes de la cirugía perirradicular son: lograr un correcto acceso al área afectada para lograr la remoción completa de los tejidos con lesión, valorar la circunferencia de la raíz y sistema de conducto radicular, realizar la apicectomía o resección del ápice de la raíz y lograr la obturación del ápice radicular con un material que estimule la regeneración del periodonto (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010).

El acceso quirúrgico de la cirugía perirradicular debe basarse en los siguientes principios (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

1. Conocimiento de las estructuras anatómicas musculares, óseas, vasculares, nerviosas, dentales y su correlación.
2. Disminuir al máximo el traumatismo causado por la intervención quirúrgica, preservando el diente involucrado y sus estructuras de soporte.

3. La manipulación de tejidos e instrumentos debe realizarse de manera que se preserven los tejidos sanos y se eliminen por completo los tejidos con lesión.

5.5.9. Definición y Clasificación de Colgajos

El acceso quirúrgico requiere del diseño de un colgajo el cual es “una porción de tejido que es separado del área donante con la finalidad de facilitar el acceso a una lesión o para recubrir algún defecto. Se mantiene vital debido a la existencia de un puente de unión, a través del cual le llega aporte vascular que es conocido como pedículo” (Raspall, 2006).

Existen tres tipos de colgajos los cuales son:

1. Colgajo de grosor parcial
2. Colgajo de grosor total
3. Colgajo óseos pediculados

Los colgajos también se clasifican según su posición es decir en tres grupos: el primer grupo son los colgajos en los que se hace la incisión horizontal por el margen gingival, el segundo grupo cuando se realiza la misma incisión en la encía adherida y el tercer grupo en los que se realiza la incisión sobre la mucosa oral (Raspall, 2006).

Raspall resume en la siguiente tabla los principios básicos del diseño de colgajo en la cavidad oral (2006):

Tabla 1. Principios de Colgajos quirúrgicos

1	Deben evitarse en lo posible las principales estructuras vasculo nerviosas de la cavidad oral.
2	La incisión no debe cruzar el defecto óseo subyacente previo a la

	cirugía o como consecuencia de ella, para así favorecer la curación de los tejidos
3	Las incisiones verticales deben efectuarse en las concavidades entre las eminencias óseas, evitando realizarlas sobre cualquier resalte o irregularidad del hueso.
4	La base del colgajo siempre debe ser más ancha que su borde libre para asegurar su correcta vascularización.
5	En los colgajos de grosor total el periostio debe elevarse en bloque con el resto de tejidos que componen el colgajo.
6	El colgajo debe extenderse lo necesario para permitir la visualización adecuada de la lesión. Su tamaño no afecta la cicatrización, precisándose como norma general, que abarque entre uno y dos dientes a cada lado de la lesión.

Los colgajos que se clasifican según su posición van a presentar diversas características tanto positivas como negativas, los colgajos que se realizan a partir de una incisión horizontal en el margen gingival tienen varias ventajas como facilitar el raspado radicular, reposicionamiento del colgajo fácil ya que cuenta con puntos de referencia, permite la alveoloplastia y por lo general esta incisión no cruza la lesión preexistente. Por otro lado sus desventajas principales son: dificultad en el momento de elevar el colgajo, sutura interdientaria de mayor complejidad, arrancamiento de fibras periodontales lo cual provoca una aparición secundaria de retracción del margen gingival y bolsas periodontales y por último una cicatrización menos rápida. Por lo antes mencionado no se recomienda

realizar este tipo de colgajo en piezas dentales con prótesis fija ya que la retracción gingival afectará el sellado marginal y estética de la misma (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004).

Los colgajos en el margen gingival son: colgajo triangular, colgajo de Neumann y colgajo gingival o en sobre. A continuación se describe cada uno (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004):

- a) **Colgajo triangular:** su diseño se compone de una incisión horizontal sobre la cresta marginal que está unida a una liberatriz o descarga única vertical. La descarga debe estar entre las eminencias radiculares de los dientes y solo se puede aplicar este colgajo en dientes con raíces cortas. Este colgajo mantiene la mejor vascularización de los tejidos (Raspall, 2006).
- b) **Colgajo de Neumann o mucoperióstico interpapilar completo:** su diseño se compone de un trapecio invertido, la incisión horizontal se realiza de la misma manera a través de la cresta gingival que está unida a dos descargas verticales superiores. En este tipo de colgajo se da la elevación completa de las papilas interdentarias, encía insertada y mucosa alveolar. Este colgajo da gran visibilidad del área quirúrgica, el sangrado es menor porque es casi en su totalidad subperióstico, permite el acceso necesario para curetaje periodontal y cualquier tratamiento en hueso, también su cicatrización es óptima. Sin embargo tiene desventajas como el compromiso vascular en el reborde gingival y exposición de márgenes coronarios alterando la estética (Raspall, 2006).
- c) **Colgajo gingival o en sobre (envolvente):** la incisión horizontal se realiza por el surco gingival, esta debe ser amplia involucrando una extensión de 4 a 5 dientes para permitir la elevación del tejido subgingival y la papila y de esta manera dar

una buena visualización. Este colgajo se realiza principalmente en el paladar y zona lingual inferior, pero no se recomienda en dientes con raíces largas. Es un tipo de colgajo que provoca gran sangrado y genera más tensión en el tejido con los separadores (Raspall, 2006).

Los colgajos que se diseñan con una incisión horizontal sobre la encía adherida precisan una técnica quirúrgica más simple y facilitan una higiene oral buena después de la cirugía. Por otro lado el principal inconveniente es que el acceso al campo de intervención no es bueno, también hay mayor probabilidad de que la línea de incisión este cerca del defecto, se provoca mayor sangrado, la reposición del colgajo tiene mayor dificultad ya que no hay puntos de referencia específicos, también las inserciones musculares y frenillos alteran el trayecto de la incisión y en cuanto a la cicatrización esta es alterada por el constante movimiento labial lo que puede dar como resultado cicatrices poco estéticas. Los colgajos que tienen una incisión horizontal sobre la encía adherida son (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004):

- a) **Colgajo Semilunar de Partsch:** su diseño es simple ya que no afecta el reborde marginal, la incisión comienza desde el pliegue muco-gingival dibujando una línea en forma de medialuna hacia la encía. La parte más convexa de la medialuna debe estar a 5-10 mm de los extremos de la incisión. Se utilice principalmente para tener acceso a ápices únicos aunque el sangrado es mayor y el campo de visualidad es reducido. Otra desventaja es que puede provocar retracciones cicatrízales. No se indica este colgajo si hay que acceder a más de una raíz en la pieza afectada o si se tiene que incidir sobre el frenillo labial, inserciones musculares y otras eminencias como la canina.

- b) Colgajo trapezoidal de Luebke-Ochsebein:** este colgajo tiene un diseño en forma de trapecio, en el que su borde inferior se realiza de forma festoneada siguiendo la morfología del reborde gingival sobre la encía adherida. Es indicado en piezas con prótesis fija ya que previene la retracción gingival posterior a la cirugía. Este colgajo debe ser realizado respetando siempre como mínimo 4 mm de encía adherida. Entre sus desventajas están que la sutura es compleja, el campo quirúrgico presenta un mayor sangrado, forma cicatrices, se pueden necrosar los vértices y se debe limitar a la parte anterior del maxilar.
- c) Colgajo semilunar de Wassmund:** este colgajo es modificado del colgajo trapezoidal en sus vértices ya que se realiza la incisión de forma que sean curvos y no agudos para prevenir la necrosis en estas áreas propensas.
- d) Colgajo en arco de Harnish:** es también un colgajo en forma de trapecio con una base mucho más ancha que el borde libre y presenta las incisiones verticales con cierta convexidad hacia el colgajo.
- e) Colgajo de ángulo de Haven-Stein-Reinmoller:** es semejante al colgajo triangular con la única diferencia que se realiza la incisión horizontal sobre la encía adherida.
- f) Colgajo Vertical de Eskici:** se realiza una única incisión vertical adyacente al diente que será tratado, es decir se accede al ápice por medio del “ojal” que se crea a partir de la incisión. Este tipo de colgajo respeta los tejidos sin embargo no permite una buena visibilidad ni acceso al campo operatorio.

Los colgajos que se realizan con incisión en la encía libre y mucosa oral son (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004):

- a) **Colgajo labial:** se realiza a partir de una incisión horizontal en la mucosa labial que esta adyacente al pliegue mucobucal, esta se debe extender de 1 a 2 dientes de la pieza con el defecto. De esta manera se levanta un colgajo mucoperiostico a fin de tener acceso al ápice, se pueden realizar descargas o hacer la incisión de forma semilunar si se requiere.
- b) **Colgajo semilunar invertido de Pichler:** este colgajo es semilunar pero su convexidad está hacia apical y sus extremos llegan hasta la encía adherida.

Después de mencionar todos los diseños de colgajos caracterizados por su localización, diseño, ventajas y desventajas es imprescindible que la técnica de elevación de estos sea realizada de manera correcta a fin de preservar los tejidos lo mejor posible durante y después de la cirugía perirradicular. Es importante recalcar que si la técnica de elevación del colgajo no se realiza de manera cuidadosa se puede causar dilaceraciones en los tejidos provocando hemorragia, mayor riesgo de infección, complejidad en sutura, mala cicatrización y mal resultado estético (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004).

El despegamiento mucoso o mucoperiostico para elevar un colgajo se debe realizar de manera que el mismo mantenga su vitalidad, funciones y pueda reposicionarse en su lugar original adecuadamente. Después de realizar la incisión con hoja de bisturí número 15 con un trazo único y firme, se procede a elevar el colgajo de la manera menos traumática posible para evitar la necrosis tisular y desgarros en el tejido lo cual afectaría a la cicatrización posterior y podría tener complicaciones posoperatorias como infección o dolor. La incisión debe tener la profundidad suficiente para la posterior elevación del colgajo, en el caso de no ser así este no se podrá elevar y el hueso subyacente tendrá restos de periostio. Estos restos deben ser seccionados con el bisturí antes de seguir con la elevación del colgajo. Cuando se separa inadecuadamente el periostio de la capa mucosa

se hace más lento el proceso de cicatrización. En el caso de realizarse una incisión mucoperióstica adecuada, se prepara un colgajo de espesor completo y se realiza el despegamiento del mismo con un periostótomo o legra. El periostótomo se debe apoyar en el hueso subyacente y de esta manera levantar el periostio de la inserción ósea. Ciertas veces pueden interferir en la elevación del colgajo las inserciones musculares o frenillos los cuales se pueden legar y despegar de hueso para que se puedan liberar conjuntamente con el colgajo (Raspall, 2006).

A continuación se describe el uso del periostótomo según Gay Escoda (2043):

- Colocar el extremo romo más ancho del periostótomo o legra entre los labios de la incisión justamente entre el hueso y mucoperiostio, se empieza en la encía adherida en la zona del ángulo formado entre la incisión vertical y horizontal del colgajo.
- Se debe siempre colocar el lado cóncavo del periostótomo hacia hueso y la parte convexa contra el tejido blando para evitar provocar desgarros o perforaciones en el colgajo.
- Los tres movimientos que se realizan en la elevación del colgajo son: empujar, levantar y retirar, se pueden hacer movimientos laterales pero con mucho cuidado.
- La forma de coger el periostótomo es como la de coger un lápiz y al realizar los movimiento mencionados se gira al instrumento sobre su mayor eje.
- Se debe desprender el colgajo en toda la extensión del mismo. Cuando se eleva el colgajo se retrae este con un separador de Minnesota o Farabeuf de manera constante, delicada y sin ejercer presión o tracción excesiva que pueda lesionar los tejidos. El separador ayuda a dar una correcta

visualización y facilitar el acceso a la zona quirúrgica. Siempre el extremo del separador debe estar firme y en contacto con hueso cortical, nunca puede apoyarse en los tejidos blandos (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004).

La elevación del colgajo en ciertos casos se puede complicar, por ejemplo cuando existen lesiones de gran tamaño en las que se ha perdido la cortical ósea y el tejido de granulación está fuera de hueso. En estos caso se da una adherencia entre el tejido de granulación y tejido submucoso, también se puede provocar una fibrosis por una inflamación crónica del tejido lo cual afectará a la elevación del colgajo dificultando el procedimiento. Si la unión entre la mucosa y hueso es estrecha o si se da una adherencia a los planos profundos patológicos con la mucosa es recomendado utilizar bisturí o tijeras finas para separar y levantar el colgajo. Por otro lado si hay la presencia de una fístula o trayecto de drenaje el cual estar rodeado de tejido granuloso y fibroso se debe intentar hacer la incisión de tal manera que la fístula este dentro de la línea de incisión a fin de que no se desgarre el colgajo en la parte afectada por la fístula. Si duda en todos los casos mencionados es más difícil definir el plano de disección y se pueden dar perforaciones en el colgajo afectando su aporte vascular (Gay Escoda, C. & Berini, L., 2004).

5.5.9. Acceso del tejido óseo

Es esencial considerar los principios biológicos para remover hueso y tener un acceso adecuado a los ápices de las piezas afectadas. En primer lugar, se debe preservar el tejido óseo sano adyacente a la lesión y controlar la generación de calor en hueso durante la cirugía. Se ha reportado que el incremento de la temperatura en hueso que sobrepase la temperatura corporal normal puede alterar la curación de los tejidos óseos afectando la formación de hueso, inactivando la fosfatasa alcalina y lesionando las células irreversiblemente de tal manera que se afecte la osteogénesis. Es muy importante

considerar el tiempo de generación de calor y el grado de aumento del mismo para determinar la magnitud en la que se puede afectar el tejido óseo. Para evitar una generación de calor excesiva se debe utilizar una fresa apropiada que es en este caso una redonda la cual tiene una forma para resecar más tejido óseo, se debe utilizar un refrigerante también que penetre en toda la superficie de corte y no se debe presionar los tejidos excesivamente con la fresa sino al contrario hacerlo de manera suave con una técnica de golpe de cepillo. Con lo mencionado anteriormente se producirá menos inflamación posoperatoria, una curación adecuada y se disminuirá cualquier riesgo de provocar necrosis en el tejido óseo (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.5.10. Raspado de lesión periapical

Las lesiones periapicales son por lo general clasificados histológicamente como granulomas o quistes, estos como ya se mencionó anteriormente son formados por tejido de granulación, fibras de tejido conectivo, infiltrado inflamatorio, células de defensa y epitelio estimulado. Las lesiones periapicales se desarrollan ya que responden a la inflamación provocada por los microorganismos presentes en el conducto radicular y tejidos circundantes. El objetivo principal de la cirugía perirradicular es consiguientemente resecar todo el tejido enfermo e irritante relacionado con el ápice de la raíz del diente afectado. Para resecar este tejido se puede usar varias técnicas, una de ellas es separar el tejido enfermo de su cripta ósea por sus bordes laterales con una letra. La letra debe tener su parte cóncava dirigido hacia la pared interior de la cripta ósea. Una vez separados los bordes de la lesión se puede proceder a separarla de la pared medial de la cripta ósea y así resecarla por completo de la cavidad con una cureta o letra. Después de remover el tejido enfermo se realiza el raspado perirradicular de la superficie de la raíz afectada con el fin de eliminar cualquier irritante restante y dar un mejor acceso para el posterior tratamiento de

conducto apical (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.5.11. Técnica y manejo del ápice radicular

El ápice radicular debe ser tratado de tal manera que su manipulación garantice la regeneración futura del periodonto que lo rodea, con el fin de lograr la remodelación del hueso alveolar, LPD y cemento alrededor del ápice resecaado y el material de obturación apical. Para la regeneración es esencial la presencia de células inducibles, sustancias mineralizadoras y factores de crecimiento, sin embargo si la manipulación del ápice no crea un ambiente propicio para la regeneración del periodonto, puede ocurrir la reparación tisular la cual no regenera los tejidos y no tiene la misma curación esperada (Signoretto, F. et al, 2011).

Siguiendo los objetivos de la cirugía perirradicular, se debe eliminar en primer lugar el factor etiológico que es por lo general la presencia bacteriana a nivel del ápice radicular y después impedir que se re-contaminen los tejidos perirradiculares tras haber resecaado el factor causal de la lesión. Para prevenir la extrusión de cualquier irritante intraconducto hacia los tejidos perirradiculares se debe realizar la obturación apical del ápice resecaado a fin de conseguir sellado apical y que no persista la enfermedad (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010).

En la mayoría de casos la lesión no cede debido a la presencia bacteriana a nivel de las ramificaciones del ápice de la raíz con lo que la única manera de eliminar esto es resecaado un mínimo de 3 mm del ápice. Se ha establecido que alrededor del 75% de los dientes poseen la mayor cantidad de aberraciones de conductos laterales y accesorios en los 3 mm apicales de la pieza dental por lo que se recomienda resecaar por lo menos esta longitud para erradicar de la pieza la mayoría de aberraciones que tengan presencia bacteriana. En el momento de la resección se debe conservar las estructuras de soporte y traumatizarlas lo

menos posible. Se puede tener un mejor acceso al ápice con un microscopio, lo cual mejora la visualización del área intervenida y ayuda a la preparación del acceso del ápice en el que se debe colocar una obturación (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010).

Después de mencionar longitud de resección del ápice es también importante mencionar que el ángulo resección debe ser perpendicular al eje longitudinal del diente. Esto debe realizarse así ya que siguiendo los fundamentos anatómicos del diente se consigue (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

- Incluir la mayor presencia de ramificaciones apicales
- Disminuir el número de túbulos dentinarios que comuniquen el conducto y el tejido perirradicular.
- Disminuir la cantidad de irritantes que puedan movilizarse desde el conducto a los tejidos perirradiculares.
- Facilita la preparación de la cavidad del ápice reseca para su posterior obturación.
- Reduce el riesgo de producir fracturas apicales durante la resección.

En cuanto a la preparación del ápice radicular reseca, debe ser realizado de tal manera que se produzcan las condiciones adecuadas para la regeneración del LPD alrededor del ápice reseca. Es de extrema importancia que cemento sano esté presente en el ápice radicular ya que el cemento posee diversos factores que ayudan a la migración, desarrollo y adherencia de los fibroblastos del LPD a la superficie radicular tratada, con lo que se logra la regeneración del periodonto (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

El acondicionamiento del ápice de la raíz también se ha reportado como

beneficioso para disminuir el barrillo dentinario producido y generar una superficie que estimule la unión de células periodontales para la regeneración. Este acondicionamiento se ha realizado principalmente con ácido cítrico el cual ayuda al desarrollo de la cementogénesis, sin embargo se han reportado desventajas como afecciones a los tejidos adyacentes por el pH tan bajo de la solución. Existen otras sustancias para acondicionar las superficies como el EDTA y la tetraciclina, sin embargo no se ha probado en estudios sus beneficios con exactitud. Adicionalmente a lo mencionado la superficie del ápice tratado debe ser lo más lisa posible después de la resección para que no existan bordes ni espolones que puedan interferir en la curación de los tejidos (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010).

Después de la preparación del ápice, se debe proceder a realizar el acceso apical para efectuar la obturación del ápice reseado. La cavidad tiene que tener por lo menos 3 mm de profundidad dentro del conducto siguiendo el eje largo del diente para lograr un sellado apical satisfactorio. La preparación se puede efectuar con puntas de ultrasonido lo cual disminuye el riesgo de perforación del diente, estas deben siempre ser utilizadas con abundante irrigación ya que el calor generado puede afectar los tejidos periodontales adyacentes e impedir la regeneración del periodonto deseada (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Una vez creada la cavidad y acceso adecuados para la obturación apical se puede proceder a colocar el material escogido para sellar el conducto. El material obturador ideal debe tener las siguientes características: biocompatibilidad, ser reabsorbible, impedir la salida de bacterias hacia los tejidos perirradiculares, tener estabilidad dimensional, inducir a las células para la regeneración del periodonto y ser de fácil preparación y manipulación (Signoretti, F. et al, 2011).

Existen diversos materiales para la obturación apical, sin embargo el agregado de trióxido mineral también conocido como MTA continua siendo el material de elección para estimular la regeneración del periodonto. El MTA fue elaborado específicamente para obturar el ápice radicular y presenta las siguientes características (Apaydin, E., Shabahang, S. & Torabinajed, M., 2004):

- Impide la filtración
- Su fraguado no es afectado en presencia de líquidos como la sangre.
- Radiopaco
- Presenta menor toxicidad que los otros materiales de obturación.
- Provoca menor inflamación perirradicular
- Permite la aposición de cemento junto a la obturación del ápice, los cementoblastos son capaces de unirse al MTA y formar cemento sobre el mismo.
- Inductor celular: induce a los cementoblastos para la formación de tejido duro.

5.5.12. Sutura

Una vez concluida la obturación apical, se puede proceder a tomar una radiografía para verificar la calidad de la obturación efectuada en términos de densidad y profundidad. Si esta satisface estos requisitos se procede a irrigar la cavidad con suero salino para eliminar restos de tejido o material y se puede reposicionar el colgajo. Al colocar el colgajo en su posición original se puede comprimir de manera suave el tejido y proceder primeramente a suturar con una sutura tamaño 5-0 en los ángulos del colgajo con puntos simples. Después se puede suturar los bordes restantes del colgajo aproximándolos íntimamente a los tejidos blandos fijos sin generar mucha tensión en los puntos de sutura ya que pueden afectar la

vascularización de los tejidos. Al finalizar la sutura se puede presionar el colgajo levemente con una gasa para dar estabilidad a la primera fase de fibrina en la que se forma el coágulo ayudando de esta manera a la hemostasia. El material de sutura indicado la cirugía perirradicular tiene que tener una superficie lisa para que no se adhieran las bacterias, debe ser flexible, presentar resistencia a la torsión y tener un precio razonable. Se puede utilizar seda, suturas con cubierta de Teflón, suturas sintéticas de monofilamento, suturas de gortex, entre otras. Las suturas de materiales reabsorbibles no están indicadas en la cirugía perirradicular ya que su velocidad de reabsorción es muy versátil y esto podría afectar al proceso de curación de los tejidos. A pesar de lo mencionado se podría usar una sutura reabsorbible en ciertos casos específicos que presente el paciente (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Al concluir la sutura, se debe indicar al paciente que permanezca sentado durante quince minutos y verificar que no haya hemorragia después del tiempo indicado para dar de alta al paciente (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.6. Relación de la regeneración tisular guiada con la cirugía perirradicular

El pronóstico de la cirugía perirradicular va a depender de diversos factores como el diámetro de la lesión periapical, cantidad de hueso vestibular perdido, problemas periodontales de la pieza tratada y ausencia de tejido óseo sobre la raíz del diente. Si el diámetro de la lesión es mayor de 10 mm o si la pérdida de hueso vestibular es muy significativa, la curación de los tejidos perirradiculares se puede retrasar e incluso puede fallar el tratamiento ya que en lugar de formarse tejido óseo en la cavidad intervenida, se formará tejido epitelial y no osteógeno dando como resultado el fracaso de la cirugía perirradicular. Consecuentemente en lesiones periapicales extensas que afecten y reabsorban el hueso circundante se deberá controlar la proliferación del tejido epitelial para

que este no se reemplace la formación de tejido óseo. Para controlar la proliferación del tejido epitelial sobre el tejido óseo se debe recurrir a la regeneración tisular guiada. La regeneración tisular guiada (RTG) se basa en que diversos tipos de células se dirigen hacia la herida para proliferar en ella a diferentes velocidades en el proceso de curación. Con este principio mencionado es importante tomar en cuenta que las células de los tejidos blandos proliferan con mayor velocidad y son más móviles que las células pertenecientes a los tejidos duros, esto resulta en que la herida es repoblada más rápidamente por tejido epitelial que por tejido óseo. Para evitar esto se debe recurrir a la colocación de barreras las cuales separen el tejido gingival del hueso alveolar y superficie radicular a fin de que las células del tejido blando no puedan colonizar la herida y en su lugar proliferen células selectivas del LPD y del tejido óseo que provoquen la regeneración de los tejidos. Varios estudios han reportado que la colocación de membranas reabsorbibles para la RTG en cirugía perirradicular de casos con defectos óseos vestibulares ha dado resultados muy positivos en el proceso de curación de los tejidos y regeneración de tejido óseo favoreciendo así el pronóstico de la cirugía. Cabe a recalcar que las membranas requieren un soporte para que no se colapsen sobre el defecto, este apoyo puede ser un injerto óseo el cual también puede ayudar a formación de hueso dependiendo de sus características de osteoinducción y osteoconducción (Von Arx, Peñarrocha & Jensen, 2010).

5.7. Complicaciones posoperatorias de la cirugía perirradicular

Entre las complicaciones principales de la cirugía perirradicular están (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

- Perforación y exposición de la membrana del seno maxilar en la que se debe indicar antibióticos y descongestionantes nasales.

- Parestesias
- Traumatismos de los fascículos neurovasculares
- Tumefacción
- Hemorragia
- Hematoma
- Infección
- Equimosis
- Dolor el cual puede ser controlado con la prescripción de AINES como el ibuprofeno y en el caso de ser un dolor fuerte se puede combinar con paracetamol en un régimen de hora fija para las dosis.

5.8. Principios Biológicos de regeneración y reparación

La cirugía tiene como objetivo lograr la regeneración de los tejidos después de la intervención con el fin de que estos puedan recuperar su función normal y microestructura. Sin embargo la reparación también puede llevarse a cabo la cual forma un tejido cicatrización después de la intervención, en lo cual no se recupera la función ni estructura original del tejido. Las heridas deben pasar por las tres fases de curación que son: inflamatoria, proliferativa y de maduración, de acuerdo a estas fases se podrá determinar su evolución. Es importante mencionar que tomando en cuenta la cirugía perirradicular, en el cual se afectan varios tejidos simultáneamente, las fases de la curación se desarrollaran a diferentes ritmos de acuerdo a cada tejido (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

La curación de los tejidos blandos empieza con la formación del coágulo en la que en primer lugar se da una vasoconstricción y desgranulación de las plaquetas con lo que se libera serotonina. La serotonina ejerce un efecto sobre las células endoteliales que

provoca el aumento de permeabilidad del vaso por lo que puede ingresar en la herida un exudado con gran contenido de proteínas. Seguido a este fenómeno se da la agregación intravascular de plaquetas y consiguientemente la formación de un tapón. Después de los dos fenómenos se activaran tanto la vía intrínseca como extrínseca de la coagulación. Mientras esto ocurre, se activaran también “el sistema de las cininas, el complemento, la fibrinólisis y formación de plasmina” (Cohen, S. & Burns, R., 2011). Estos fenómenos estabilizan la hemostasia, comienzan la producción de mitógenos y factores quimiotácticos e inician el proceso de descontaminación de la herida. Todo el proceso tendrá como objetivo formar un coágulo de hebras de fibrina que contenga exudado sérico, eritrocitos y células de la inflamación. Al cerrar el colgajo en el caso de la cirugía perirradicular, se debe comprimirlo con una gasa inmediatamente con el fin de reducir el grosor del coágulo de fibrina para una mejor curación de la herida (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Después de la formación del coágulo se va a llevar a cabo la inflamación temprana en la que se da la organización de los neutrófilos polimorfonucleares o PMN. Los PMN migraran hacia el área de la herida mediado por la producción previa de los factores quimiotácticos. Entre las 24 y 48 horas después de la lesión, los PMN llegarán a su número máximo. Esta migración de los PMN hacia el lugar de la herida se establecerá en tres etapas que son (Cohen, S. & Burns, R., 2011):

1. Pavimentado: en esta etapa los eritrocitos provocan la aglutinación intravascular con lo que los PMN pueden adherirse a las células endoteliales
2. Emigración: cuando los PMN atraviesan de forma activa la pared vascular.

3. Migración: cuando los PMN van hasta los tejidos lesionados por medio de su movimiento ameboide y la influencia de los mediadores quimiotácticos. Los PMN fagocitan las bacterias presentes en la herida por lo que su principal función es evitar la infección posoperatoria de la misma.

Después del tercer día de la lesión, la concentración de PMN bajará significativamente y se llevará a cabo la inflamación tardía en la que ocurre la organización de los macrófagos. Los macrófagos llegarán al área de la herida y su concentración máxima será entre el tercer y cuarto día en esta zona. Los macrófagos son inicialmente monocitos que circulan en el torrente sanguíneo y salen a la zona de la herida por la influencia de los factores quimiotácticos de la inflamación. En el momento que el monocito es atraído y llega a la zona afectada se convierte macrófago. Sin embargo en contraste con los PMN, los macrófagos tienen mayor esperanza de vida ya que estos se van a quedar en la herida para realizar fagocitosis de microorganismos, desechos y restos de tejidos hasta que la curación de la misma sea completa. Los macrófagos son también bioactivos es decir que parte de su función es secretar diversas citocinas las cuales influyen de manera significativa para que empiece la fase proliferativa en la curación de las heridas, esto ocurre porque se acelera la formación del tejido de granulación. Los macrófagos son indispensables para que la curación de la herida se lleve a cabo, es decir que si reduce el número de estos en la zona afectada sin duda el proceso de curación se retrasará. Aparte de lo mencionado, los macrófagos también tienen como función la ingestión y proceso de los antígenos, los cuales serán después presentados a los linfocitos T que llegarán al lugar de la lesión posteriormente (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Seguida a esta fase viene de la fase proliferativa de los tejidos blandos, en esta fase

se da principalmente la formación de tejido de granulación en el lugar de la herida. En esta fase los fibroblastos y células endoteliales serán las principales precursoras de la formación del tejido de granulación. Este tejido es descrito como “una matriz extracelular de fibrina, fibronectina, glucosaminoglicanos, células endoteliales en proliferación, nuevos capilares y fibroblastos mezclados con macrófagos inflamatorios y linfocitos” (Cohen, S. & Burns, R., 2011). En esta fase ocurre la fibroplasia, los fibroblastos y las células ectomesenquimatosas van hacia el área de la herida y llegan a su número máximo en alrededor de siete días. La migración de los fibroblastos y células ectomesenquimatosas es influenciada por las citocinas en las que se destacan el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento de los fibroblastos y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S., 2010). Todos los factores mencionados se producen en las plaquetas, macrófagos y linfocitos. Durante este proceso el tejido granulomatoso de la herida se convierte en tejido de granulación ya que aumenta el número de fibroblastos y disminuye el de macrófagos en el área de la herida. Los fibroblastos son los precursores de la curación de la herida ya que producen colágeno el cual se deposita en fibras formando una red mientras las células musculares lisas y endoteliales migran a la zona afectada. Posteriormente las fibras de colágeno se organizan formando enlaces que se cruzan de forma alineada a fin de resistir la tensión de la herida. Los miofibroblastos serán muy importantes en el proceso ya que se encargaran de contraer la herida existente posicionándose de forma alineada y paralela en su superficie para contraerse y de esta manera acercar los bordes opuestos logrando su cierre. Los miofibroblastos al concluir el cierre serán eliminados de por medio de apoptosis (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

La angiogenia también será indispensable para proporcionar vascularización a la

herida y lograr su proceso de curación. Los capilares se forman en toda la periferia de los vasos de la herida desde los primeros tres días y estos se organizan en una red de asas o plexos capilares alrededor de la misma. Los factores principales que influyen en la formación de vasos sanguíneos son el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento y transformación alfa y beta, el factor de crecimiento básico de los fibroblastos, el factor de necrosis tumoral, el FGF ácido y el ácido láctico (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Seguidamente se llevará a cabo el proceso de curación del epitelio el cual en primer lugar comienza formando un sello epitelial encima del coágulo de fibrina en la herida. La curación se da porque las células basales y espinosas suprabasales localizadas en los bordes de las heridas se reproducen por mitosis y migran atravesando el coágulo de fibrina hasta entrar en contacto con las células epiteliales del borde opuesto que también migraron. Se forma como resultado una mono-capa celular encima del coágulo de fibrina y de esta manera se alcanza un sellado epitelial de la herida. En el caso de las heridas que se curan por primera intención, este proceso demora de 21 a 28 horas. A continuación se llevará a cabo la fase de maduración en la que la monocapa celular va a pasar por mitosis y diferenciación para formar una capa de epitelio escamoso estratificado que actuará finalmente como una barrera de protección de la herida frente a los microorganismos de la cavidad oral y le dará una resistencia a la tracción significativa. Esta barrera se forma entre las 36 y 42 horas después de realizarse la sutura de la herida (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

La fase de maduración en la curación de los tejidos duros se desarrolla de manera distinta a la de los tejidos blandos. Las heridas óseas causadas por escisión de alrededor de 1 cm de diámetro van a seguir un proceso de curación parecido al de un hueso largo

fracturado. Esta curación se da de la siguiente manera: empieza como hematoma, pasa por la inflamación, elimina los desechos producidos, se forma el tejido de granulación, se desarrolla el callo, se transforma el hueso reticular en laminar y por último ocurre la remodelación ósea. En todo el proceso los osteoclastos toman un papel muy importante ya que son “la unidad organizativa” (Cohen, 2011) que se encarga de desbridar el tejido óseo necrótico que se encuentra en los extremos de la herida. Primeramente entre los 2 y 4 días después de la resección del ápice radicular, prolifera el tejido de granulación en el ligamento periodontal afectado. El tejido formado rodea el nuevo ápice radicular y ocurre al mismo tiempo una “proliferación endóstica hacia el coágulo desde la superficie profunda del borde de la herida ósea” (Cohen) por lo que consecuentemente se transforma el coágulo en tejido de granulación. En este momento se da la migración de células como los pre-osteoblastos, osteoblastos y células osteoprogenitoras las cuales son las precursoras de la formación de hueso reticular en la masa formada anteriormente por tejido de granulación. Después de seis días de la apicectomía empieza la formación de nuevo hueso en la herida (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Los tipos de formación de hueso se dividen en dos:

- Basado en una vesícula de matriz: que forma el hueso reticular
- Basado en la secreción de osteoide que forma el hueso laminar

Las dos maneras de formación de hueso se van a basar principalmente en la acción de los osteoblastos para formar la matriz ósea por medio de la secreción de la sustancia fundamental que contiene colágeno el cual es imprescindible para la mineralización del tejido. En el proceso de formación de tejido óseo intervienen también varios factores de crecimiento importantes como el BMP (Bone Morphogenetic Protein), TGF-Beta, IGF, FGF Y PDGF (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Después de cuatro semanas posteriores a la resección del ápice, se puede observar que la herida en el tejido óseo está nuevamente compuesta en un 80% por trabéculas, células osteoides y osteoblastos activos. El nuevo periostio tiene gran contenido celular y se forma sobre la superficie exterior de la herida. Al pasar cuatro semanas más es decir ocho semanas en total, las trabéculas óseas son más densas, hay menos células osteoides relacionadas a la maduración, la actividad de los osteoblastos disminuye considerablemente y el periostio ya está formado, el cual recubre el nuevo hueso. Sin embargo hay que esperar 16 semanas después de la cirugía para que la herida ósea finalmente este ocupada de hueso nuevo. Es importante mencionar que después de cuatro meses la placa cortical no estará formada completamente y el proceso continuará por varios meses por medio de la maduración y remodelación ósea (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

Simultáneamente a la regeneración de los tejidos, se va a provocar la formación de nuevo cemento alrededor del ápice que fue intervenido por cirugía. Esta formación de cemento conocida también como cementogénesis ocurre después de diez días de la resección del ápice y es esencial ya que previene la reabsorción asociada a la pieza dental porque los osteoclastos no actúan sobre el cemento al no tener afinidad por el mismo. Transcurridos 28 días de la cirugía, el cemento formado rodea toda la raíz intervenida y se forman las fibras del ligamento periodontal reorientadas al nuevo ápice (Cohen, S. & Burns, R., 2011).

5.9. Microbiología de las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico

Existen más de 700 especies de microorganismos en la flora oral de las cuales tan solo el 50% han podido ser identificadas por medio de cultivos. Actualmente las nuevas técnicas moleculares son una gran herramienta para detectar las especies involucradas en la flora oral y en este caso específicamente en la fisiopatología de la periodontitis apical. Las nuevas técnicas moleculares de análisis de ADN bacteriano reflejan que las infecciones endodónticas son más complejas de lo que antiguamente se pensaba ya que tienen una naturaleza poli-microbiana, estas investigaciones también demuestran que la gran mayoría de bacterias asociadas a la periodontitis periapical refractaria son Gram positivas y anaerobias facultativas. A continuación se detalla en una tabla los microorganismos asociados a la persistencia de la enfermedad periapical, en la que se clasifica cada microorganismo según los estudios que lo refieren, el porcentaje en el que se ha encontrado, sus factores virulencia y si pertenece a la flora oral normal:

Tabla 2. Microorganismos asociados a la periodontitis periapical refractaria

Microorganismo	Referencias que lo asocian a Periodontitis Periapical Refractaria	% de la incidencia	Factores de Virulencia	Presencia en Flora normal
<i>Enterococcus faecalis</i>	Socransky, 2002	75%	-adhesina a colágeno: ACE -Produce proteína extracelular: serina para adherirse a la dentina. -produce gelatinasa:	si
	Siqueira, 2005	74%		
	Stewart, 2001	75%		
	Rocas et al. 2004			
	Sedgley et al 2006			
Subramanian & Mickel	64%			

			<p>asociada a la supervivencia en los conductos obturados.</p> <p>-Produce super oxido extracelular capaz de causar lisis de los eritrocitos.</p> <p>-Plásmidos: transfieren copias de ellos de una bacteria a otra: causan diseminación de la resistencia antibiótica.</p> <p>-sobrevive a pH altos de los agentes antimicrobianos</p>	
<i>Candida albicans</i>	<p>Socransky, 2002</p> <p>Zang, 2010</p> <p>Stewart 2001</p> <p>Sunde, 2002</p>	<p>75%</p> <p>80%</p> <p>75%</p> <p>56%</p>	<p>Puede colonizar casi todos los tejidos humanos.</p> <p>-puede coagregarse con otros <i>streptococcus</i>.</p> <p>-Secretan proteasas que causan degradación de las proteínas humanas.</p> <p>-afectan a las membranas de los huéspedes.</p> <p>-se adapta a diferentes condiciones ecológicas.</p>	si

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Sunde, 2000a Gatti, 2000 Siqueira, 2005 Saber, 2010	70% 70% 21%	-Se coagrega con casi todos los microorganismos de la flora oral -Productor LPS o endotoxinas: produce una respuesta inmune rápida.	Si, encontrado especialmente en el biofilm bacteriano
<i>Peptostreptococcus</i>	Siqueira, 2005	10%	-capacidad proteolítica y de diseminarse -pueden tener sinergismo con otros microorganismos.	Si
<i>Actinomyces israeli</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Ximenez-Fyvie, 2006 Sunde, 2002	70% Gránulos de biofilm	-Colonizadores importantes de lo gránulos de biofilm. -Pioneros en la formación de la estructura del biofilm. -Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.	Si, causante de procesos infecciosos.
<i>Actinomyces viscosus</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Ximenez-Fyvie, 2006 Zang, 2010	70% Gránulos de sulfuro	-Colonizadores importantes de lo gránulos de biofilm. -Pioneros en la formación de la	si

			<p>estructura del biofilm.</p> <p>-Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.</p>	
<i>Actinomyces spp.</i>	<p>Happonen, 1986</p> <p>Wang, 2012</p> <p>Siqueira, 2005</p> <p>Saber, 2012</p>	<p>84.6%</p> <p>5.8%</p>	<p>-Colonizadores importantes de lo gránulos de biofilm.</p> <p>-Pioneros en la formación de la estructura del biofilm.</p> <p>-Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.</p>	si
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<p>Sunde, 2000</p> <p>Sunde, 2000^a</p> <p>Gatti, 2000</p>	50%	<p>-Colonizadores importantes de lo gránulos de biofilm.</p> <p>-Pioneros en la formación de la estructura del biofilm.</p> <p>-Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.</p>	si

<i>Actinomyces meyer</i>	Ximenez-Fyvie, 2006 Signoretti, 2011	Gránulos de biofilm	-Colonizadores importantes de lo gránulos de biofilm. -Pioneros en la formación de la estructura del biofilm. -Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.	si
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Sunde, 2000 ^a Ximenez-Fyvie, 2006 Signoretti, 2011	20-30% Gránulos de sulfuro	-Posee fimbriae para unirse a las células epiteliales e inflamatorias. -Colonizadores importantes de los gránulos de biofilm. -Pioneros en la formación de la estructura del biofilm. -Crean condiciones para que otras bacterias sean atraídas y puedan establecerse en la lesión.	si
<i>Propionibacterium propionicum</i>	Happonen, 1986 Socransky, 2002 Wang, 2012 Signoretti, 2011	Gránulos de biofilm 61.5%	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas) -Fimbrae: se	si

	Siqueria, 2005		adhieren a la dentina, a las células de defensa y hospederas. Se adhieren al ápex de la raíz. -Se coagregan con otras bacterias.	
<i>Propionibacterium acnes</i>	Sunde, 2000 Socransky, 2002	Gránulos de biofilm 61.5%	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	si
<i>Porphyromona gingivalis</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Loy, 2003 Zang, 2010	70% 7%	-Posee fimbriade tipo II el cual les hace muy adherente a las células epiteliales -Produce vesículas extracelulares: le ayuda a integrarse con otros microorganismos. -produce proteínas extracelulares (collagenasa)	si
<i>Porphyromona endodontalis</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Sundqvist, 1979 Wang, 2012 Zang, 2010 Siqueria, 2005 Saber, 2012	50% 50% 50% 6%	-Mantiene la infección porque provee nutrientes a los patógenos principales. -Sintetiza y degrada polisacáridos extracelulares en el biofilm.	si
<i>Porphyromonas</i>				
<i>Tannerella forsythia</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Loy, 2003	70% 7%	-	-

	Siqueira, 2005	14%		
<i>Treponema socranskii ssp. Socranskii</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000	70%	-Se adhieren a las superficies celulares. -Producen enzimas destructoras de tejido. -Varios factores de virulencia	–
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Da silva, 2002	70% 90%	-Leucotoxina: destruye las células inmunes del huésped. -Adhesinas: se puede adherir fácilmente e invadir/ reproducirse en las células eucariotas. -Se ha encontrado en otras infecciones no orales.	si
<i>Treponema denticola</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000 Siqueira, 2005	60%	--Se adhieren a las superficies celulares. -Producen enzimas destructoras de tejido. -Varios factores de virulencia	si
<i>Eikenella corrodens</i>	Sunde, 2000 ^a Gatti, 2000	40%	-Posee fimbriae para adherirse a la superficies celulares e interactuar con otras bacterias.	–
<i>Peptostreptococcus prevotti</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos	si

			oportunistas)	
<i>Gemella morbillorum</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	--Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	si
<i>Clostridium sordelli</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas) -Productoras de esporas, soportan condiciones extremas. -Secretan exotoxinas	+/- Menos del 5%
<i>Clostridium differmentas</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	+/-
<i>Leptotrichia buccalis</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	—
<i>Staphylococcus chromegenes</i>	Socransky, 2002 Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	—
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Socransky, 2002	Gránulos de sulfuro	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	—
<i>Aerococcus viridians</i>	Socransky, 2002	Gránulos de biofilm	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	—
<i>Pseudomona aureginosa</i>	Socransky, 2002	Gránulos de biofilm	-Formadores de biofilm (patógenos oportunistas)	+/-
<i>Pseudomonas</i>	Socransky, 2002	75%	-posee pilis -LPS Produce exotoxina y	+/-

			exoenzimas -produce proteasas	
<i>Staphylococcus</i>	Socransky, 2002	75%	-posee cápsula -Posee ácido teicoico -Factor de coagulación -produce citotoxinas	Si
<i>Prevotella intermedia</i>	Loy, 2003	7%	-posee fimbriae -productora endotoxinas -productora de ácidos lipoteicos	Si
<i>Prevotella sp.</i>	Wang, 2012 Saber, 2012	7.5%	-productora de endotoxinas	Si
<i>Streptococcus spp. anginosus gordonii</i>	Siquiera, 2005 Saber, 2012 Sunde, 200b	70% 21% 8%	-Produce proteínas bacterianas: contribuyen a expandir la infección -produce capsulas para bloquear las respuesta inmune del huésped. -Pared celular posee PG Y LTA. -Posee adhesinas en superficie celular.	Si

* +/- : Presente en un 50% de casos de la flora oral normal.

* - : Presencia negativa en la flora oral normal.

5.10. *Candida albicans*

El género de *Candida* corresponde a levaduras unicelulares aerobias, sus especies son casi 200 y se consideran patógenas y oportunistas ya que tienen el potencial de colonizar e infectar casi todos los tejidos humanos. *Candida albicans* entre otras especies son capaces de reproducirse en condiciones anaerobias a pesar de su naturaleza aerobia. Estos microorganismos pueden secretar proteasas las cuales degradan las proteínas humanas del huésped. Las proteasas SAP (Secreted Aspartyl Protease) que son secretadas por *Candida albicans* en los tejidos lesionados actúan de diversas formas digiriendo moléculas y células de defensa del huésped, alterando las membranas celulares del huésped y evitando la fagocitosis por parte de las mismas. Las SAPs degradan proteínas como la hemoglobina, queratina e inmunoglobulinas. Adicionalmente, *Candida albicans* es polimórfica lo cual significa que existe como blastospora en forma de levadura, como hifas o como pseudohifas las cuales son la forma de crecimiento filamentoso de la levadura. Esta cualidad de presentarse en diversas formas le da un mayor potencial para adaptarse a diferentes condiciones y ambientes en los tejidos. Las hifas son esenciales para la invasión de tejidos ya que en su punta se secretan enzimas como las fosfolipasas las cuales degradan los componentes celulares del huésped y así penetran las barreras tisulares. Se reportó en el estudio de Mostefaoui (2004) que el contacto de hifas con las células epiteliales incrementó la expresión de inmunoglobulinas y factor de necrosis tumoral (TNF). Además de lo mencionado, *Candida albicans* tiene la facultad de coagregarse con otras bacterias como los *Streptococcus* y *Actinomyces*. *Candida* también tiene la habilidad de formar biofilm en diversos tipos de superficies y coagregarse con las bacterias mencionadas lo cual la hace resistente a la anfotericina B e incrementa su patogenicidad. Se ha reportado que cuando las levaduras existen en la forma de biofilm son

8 veces más resistente a los agentes antifúngicos como el fluconazol ya que se hace más difícil la penetración de los medicamentos por la matriz de biofilm formada (Fouad, 2009).

La adherencia es un factor esencial para que estas levaduras puedan invadir y colonizar los tejidos orales, *Candida albicans* se adhiere con mayor potencial que otras especies a los tejidos lo cual es esencial en el proceso patógeno. Los mecanismos para la adherencia son: interacciones entre receptores y ligandos, fuerzas electrostáticas y la agregación. Al conocer el gran potencial de adherencia de *Candida*, es esencial que en el tratamiento endodóntico se generen mecanismos como la irrigación intraconducto con EDTA para inhibir o disminuir la adherencia de la levadura a las superficies de los tejidos.

5.11. *Enterococcus faecalis*

El género *Enterococcus* pertenece a los cocos Gram + anaerobios facultativos, las células de este género son ovoides y por lo general se disponen en parejas o cadenas cortas. La temperatura en la cual los *Enterococcus* crecen va de un rango de 10 a 45 grados Celsius. Se ha reportado que las especies de *Enterococcus* más comunes que afectan al ser humano son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, siendo *E. faecalis* causante de la endocarditis bacteriana (Fouad, 2009).

Las investigaciones presentan que *E. faecalis* es una de las principales bacterias causantes del fracaso endodóntico (Rocas, 2004), (Sedgley, 2006), (Fabricius et al, 2006), (Fouad, A. et al, 2002) ya que resiste a altos niveles de pH que tienen los medicamentos antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento endodóntico. Se ha demostrado que la capacidad del *Enterococcus* de resistir a pHs altos es gracias al gen *ftsZ* el cual actúa en la división celular, sin embargo no se ha establecido el mecanismo exacto. Adicionalmente el

Enterococcus tiene alta patogenicidad y potencial de adaptarse y sobrevivir a diversos medios ya que posee varios factores de virulencia como (Fouad, 2009):

- Proteínas de superficie del *Enterococco* (Esp)
- Serina Proteasa que intervienen en la unión al colágeno de la dentina.
- Proteínas de unión al colágeno (Ace) la cual favorece a la adhesión bacteriana de la dentina.
- Substancia de agregación (AS) lo cual le hace resistente frente a la acción de los neutrófilos del huésped.
- Factores que favorecen la secreción de proteasas como la gelatinasa, la cual se asocia a la supervivencia de *E. faecalis* en los conductos obturados.
- Factores que favorecen la secreción de toxinas como la citolisina.
- Producción de radicales libres como el super óxido celular que provoca la lisis de los eritrocitos.
- La producción de superóxido extracelular favorece también a las infecciones mixtas con especies como *Bacteroides fragilis*.
- Un aspecto genético de la virulencia del *E. faecalis* es que poseen plásmidos que transfieren copias de sí mismo de una célula bacteriana a otra por medio de péptidos que se denominan feromonas sexuales. La presencia de estos plásmidos son importantes ya que están involucrados en la diseminación de la resistencia antibiótica. El estudio de Sedgley et al (2008) reveló la

transferencia bidireccional de un gen resistente a la azitromicina por medio de plásmidos entre *E. faecalis* y *S. gordonii*.

Los estudios también han demostrado que en lesiones periapicales de mayor tamaño se ha encontrado la presencia de *E. faecalis* con otras especies de microorganismos, no obstante cuando esta bacteria ha sido identificada como única, las lesiones no presentaron tamaño significativo (Fouad, 2009).

5.12. Técnicas Moleculares para análisis microbiológico

5.12.1. Extracción de ADN

Existen diversos procedimientos preparativos de ácidos nucleicos que son realizados para obtener una cantidad determinada de material genético, este debe estar en un estado lo suficientemente puro para realizar los análisis requeridos (**Perera J., Tormo A., García J., 2002**).

Las etapas en el procedimiento de preparación generalmente son:

1. Lisis
2. Separación
3. Purificación

Los ácidos nucleicos son moléculas que se encuentran en estructuras organizadas por lo que la fase de lisis consta de romper estas estructuras que pueden ser membranas, cápsulas o paredes con el propósito de acceder a los ácidos nucleicos antes mencionados (**Perera J., Tormo A., García J., 2002**).

Los diferentes métodos de lisis pueden clasificarse en: (**Perera J., Tormo A., García J., 2002**).

- a) Físicos: en donde se realiza la ruptura directa de las estructuras por medio de diferentes técnicas como:
- ✓ Abrasión: se realiza en un mortero en el cual se macera el tejido o células mezcladas con bolas de vidrio, alúmina o arena
 - ✓ Compresión: con sistemas de compresión-descompresión y en prensas
 - ✓ Sonicación: por medio de ultrasonido
 - ✓ Cizallamiento: con homogenizadores de émbolo
 - ✓ Congelación y descongelación: colocando a las células en ciclos sucesivos de congelación y descongelación
 - ✓ Choque osmótico: se realiza mediante suspensión en medios hipotónicos
- b) Químicos: este tipo de método rompe las interacciones moleculares que mantienen a la membrana
- c) Enzimáticos: este método degrada compuestos específicos de las membranas y paredes celulares

Después de causar la ruptura de las estructuras en la fase de lisis, se va a presentar la molécula objetivo en una solución mezclada con otros tipos de moléculas variadas. La segunda fase del proceso la cual es la más complicada, consiste en fraccionar la mezcla que se mencionó es decir el aislamiento. En esta etapa se aplican técnicas de bioquímica para la separación y purificación. Al ser los ácidos nucleicos de mayor tamaño que las otras moléculas, además de hidrofílicos y de naturaleza ácida, las técnicas aprovechan estas características para separar a los ácidos nucleicos del resto de los componentes de la

mezcla. Sin embargo se sabe que en estado natural los ácidos nucleicos se asocian a proteínas básicas lo cual hace que estas macromoléculas sean contaminantes naturales de los ácidos nucleicos (Perera J., Tormo A., García J., 2002).

Entre las técnicas de bioquímica que más se utilizan para el proceso de separación están (**Perera J., Tormo A., García J., 2002**):

- a) La sedimentación especialmente en gradientes de sales de cesio, la cual permite separar moléculas de proteínas, el RNA, DNA circular plasmídico y el DNA lineal cromosómico.
- b) La cromatografía la cual retiene moléculas con doble hélice
- c) La electroforesis en gel agarosa o de poliacrilamida que permite separar moléculas de ácidos nucleicos por medio de su capacidad de desplazarse en una red de gel. La capacidad de moverse es decir la “movilidad electroforética” depende de varios factores, entre estos están las características propias de las moléculas como la forma de los ácidos nucleicos y su tamaño.
- d) La diálisis a través de membranas que elimina pequeñas moléculas como sales presentes en la disolución del ácidos nucleicos.
- e) Extracción con disolventes orgánicos por medio de fenol, el cual extrae las proteínas presentes en la disolución de ácidos nucleicos.
- f) La precipitación de ácidos nucleicos con alcoholes
- g) La digestión enzimática la cual elimina de las proteínas unidas a los ácidos nucleicos las cuales son las contaminantes universales.

Después de realizar la separación se debe tener precauciones generales ya que los ácidos nucleicos pueden ser degradados por ciertas actividades de las enzimas que se encuentran en la fuente biológica de partida. Por esto es importante anular la degradación causada por las nucleasas (enzimas) trabajando en condiciones de pulcritud, con los equipos limpios e incluir inhibidores de las nucleasas como el EDTA en todas las etapas del procedimiento que se realice extracción de ADN (**Perera J., Tormo A., García J., 2002**).

5.12.2. Amplificación de secuencias de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica del PCR ha cambiado el mundo de la biología molecular desde los años ochenta descrita por primera vez por Kary Mullis. Esta técnica resolvió uno de los principales problemas en el campo molecular el cual era aislar secuencias puras de ADN del genoma. El PCR logra la amplificación de una secuencia determinada de ADN, con la cual se puede producir muchas copias de la misma secuencia sin tener que realizar un clonaje de la secuencia(Perera J., Tormo A., García J., 2002).

La técnica del PCR se realiza in vitro tomando una secuencia exacta de ADN para su posterior amplificación, este proceso de repetición consta de tres etapas que son (Perera J., Tormo A., García J., 2002):

- Desnaturalización del ADN molde lo cual se realiza sometiendo al fragmento de ADN contenido en la disolución a altas temperaturas, se coloca el recipiente de reacción a 94 grados Celsius por un minuto.
- Hibridación de cebadores que se logra bajando la temperatura a 50 grados Celsius por dos minutos para producir la unión de cebadores o primers a las

zonas complementarias del ADN que fueron desnaturalizadas previamente. Un cebador es un oligonucleótido monocatenario que es una fiel copia de una secuencia corta de las dos hebras del ADN que está ubicada en los extremos de la región escogida para amplificar. Los cebadores se unen a su secuencia complementaria en el ADN produciendo una estructura monocatenaria cebada que es el sustrato de las polimerasas.

- Elongación la cual ocurre cuando se pone a la disolución a una temperatura adecuada que es a 72 grados Celsius por tres minutos. Por presencia de los cuatro DNTPS, la polimerasa elonga el sustrato cebado y se repite este proceso por varios ciclos hasta obtener el producto el cual es una amplificación de un “fragmento de ADN cuyos extremos corresponden a los terminales 5’ de los cebadores utilizados y cuya longitud está definida por la posición de éstos en la secuencia del ADN original” (Perera J., Tormo A., García J., 2002).

5.12.3. Aplicación microbiológica del 16S

De acuerdo a las relaciones filogenéticas que existen entre los seres vivos, se han desarrollado diversos métodos para la clasificación e identificación de los mismos. Carl Woese en el año de 1970 propuso la aplicación del ARN ribosómico 16S como cronómetro molecular de la presencia bacteriana. Los siguientes parámetros la establecen como el cronómetro molecular más aceptado y aplicado (Rodicio, M. & Mendoza, M., 2004):

- Es una molécula antigua que está presente en todas las bacterias que existen en la actualidad.
- Presenta una estructura y función que se han conservado constantes durante

un largo periodo de tiempo.

- Posee un tamaño largo (1500nt) lo cual ayuda a disminuir las fluctuaciones estadísticas.
- Es fácil de secuenciar por lo que existe mucha investigación y bases de datos

Consecuentemente, “El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana” (Rodicio, M. & Mendoza, M., 2004). . Las bacterias poseen genes que codifican los ARN ribosomales los cuales se organizan en operones, cada operón ribosómico tiene “genes para los ARNr 23S, 16S y 5S” (Rodicio, M. & Mendoza, M., 2004). El ARN 16S es “un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pares de bases, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16s)” (Rodicio, M. & Mendoza, M., 2004).

Al comparar las secuencias de los genes que codifican el 16S, se puede determinar las relaciones existentes entre los organismos procariotas y de esta manera reconocer de manera más eficaz la presencia bacteriana en los estudios microbiológicos para proceder a realizar un correcto diagnóstico y desarrollo de tratamiento. La identificación del ARN 16S es un técnica molecular que trae ventajas en tiempo y precisión, por lo que en situaciones en las que se requiere de mayor tiempo o es difícil identificar fenotípicamente la muestra, está indicado este método como uno de los más favorables

5.12.4. Electroforesis

El genoma y secuencia genética son esenciales para poder reconocer desde la familia, el tipo y cepa a la que pertenecen ciertos microorganismos. El reconocimiento de

los mismos se puede dar por medio de la identificación de su ADN o de fragmentos del mismo los cuales se forman cuando actúan las enzimas de restricción específicas. Estas atacan a la molécula de ADN y consecuentemente ocurre la escisión del ADN generando longitudes diferentes por la acción de las endonucleasas de restricción. El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción es el resultado de “las diferencias en la longitud de fragmentos de ADN entre las diferentes cepas de un microorganismo específico producidas por la restricción con una o más endonucleasas” (Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M., 2009).

Como resultado de lo mencionado anteriormente, el ADN presenta diversos tamaños en sus estructuras las cuales se pueden identificar de acuerdo a su movilidad electroforética en un gel conformado por agarosa. La electroforesis se basa en “el movimiento de las macromoléculas disueltas en un determinado medio, a través de una matriz y como resultado de la acción de un campo eléctrico” (Perera J., Tormo A., García J., 2002). Es decir que las “diferentes formas de la misma secuencia de ADN y las diferentes longitudes de ADN se mueven a través de una estructura laberíntica de un gel de agarosa a diferentes velocidades, lo que permite su separación” (Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M., 2009). Es importante recalcar que el movimiento electroforético depende del tamaño, carga y forma de la molécula, por lo que dos moléculas que presenten diferente movilidad pueden ser separadas, identificadas, caracterizadas y cuantificadas por medio de la comparación con los controles respectivos. Al ocurrir este movimiento del ADN a través del gel, se puede ver las bandas de ADN por la tinción dada por el bromuro de etidio. Los fragmentos de ADN de menos de 20.000 pares de bases que por lo general son los plásmidos bacterianos o virus son los que se pueden separar y visualizar por medio de este método electroforético (Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M., 2009).

5.12.5. Detección de ADN perteneciente a células muertas o viables por técnicas moleculares

Las técnicas moleculares actuales como la reacción en cadena de la polimerasa son capaces de identificar tanto material genético de células vivas como muertas de las bacterias presentes en los tejidos enfermos, lo cual puede ser considerado una ventaja y desventaja a la vez. En cuanto a la ventaja de reconocer ADN que proviene de células muertas, es de gran utilidad cuando las bacterias recolectadas en la muestra han sido afectadas por la transportación, aislamiento y manipulación con lo cual a pesar de morir en este proceso son reconocidas por medio del análisis de su ADN. No obstante reconocer ADN de células muertas en el tejido enfermo puede sugerir de manera falsa que la presencia bacteriana está involucrada en la fisiopatología de la enfermedad y no necesariamente ser así ya que las bacterias identificadas ya están muertas. A pesar de lo mencionado anteriormente el hecho de encontrar la presencia bacteriana de ciertas especies en los tejidos perirradiculares, es de gran importancia clínica ya que da un parámetro para seguir en cuanto al tratamiento tanto clínico como antibiótico que será más eficaz de acuerdo a las bacterias identificadas.

5.13. Tinción GRAM

La tinción Gram es un tipo de tinción microscópica que se utiliza en el laboratorio de microbiología clínica. Es una de las formas de tinción más utilizada la cual divide y diferencia las bacterias en Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a la estructura que presente su pared celular. La pared celular perteneciente a las bacterias Gram positivas (+) tiene una capa gruesa de peptidoglicanos y dos clases de ácidos teicoicos. Por otro lado las bacterias Gram negativas (-) poseen una capa de peptidoglicanos

delgada en su pared celular la cual está junta a una membrana plasmática exterior. La tinción diferencial entre estas dos clases de bacterias es definida por el grosor de la capa de peptidoglicanos en la pared celular. Las Gram negativas (–) poseen una membrana externa que es soluble en los solventes orgánicos y además como ya se mencionó tienen una capa muy delgada de peptidoglicanos la cual no puede retener el complejo formado por el cristal violeta y yodo provocando consecuentemente que estas no se tiñan de color azul en el momento de la tinción. En contraste las Gram + tienen una pared celular de un grosor alto de peptidoglicanos lo cual hace que no actúe sobre ellas el solvente orgánico como el alcohol o cetona. El solvente tiene el efecto de deshidratación en las Gram + por lo que se cierran los poros de la pared celular con lo que no se permite que el complejo de cristal violeta y yodo salga de las células y de esta manera estas células mantienen el pigmento azul (Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M., 2009).

Esta tinción se realiza de la siguiente manera (Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M., 2009):

1. Se fija la muestra en el portaobjetos de cristal con calor o alcohol.
2. Se coloca cristal violeta a la muestra por un minuto.
3. Se coloca yodo o alcohol iodado sobre la muestra por un minuto para formar un complejo con el cristal violeta.
4. Se decolora la muestra con acetona o alcohol por 15 segundos, en este proceso las bacterias Gram + van a retener el complejo y por esto presentan un pigmento azul-violeta. Por otro lado las bacterias Gram – pierden el complejo.
5. Finalmente, se coloca safranina como contracolorante por 1 minuto en la muestra, el cual es retenido por las bacterias Gram – y por esto presentan una coloración

rojiza.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tipo de estudio:

Es un estudio de casos y controles el cual es epidemiológico, analítico y observacional. En este tipo de estudio los individuos que participan son escogidos en función de que presenten o no una enfermedad específica. En el caso de tener la enfermedad formaran parte del grupo de casos y si no la tienen serán parte del grupo de control.

6.2. Muestra:

Las muestras provinieron de pacientes intervenidos en cirugía perirradicular (grupo experimental) y de pacientes intervenidos por extracción de piezas sanas sin enfermedad (grupo control) como terceros molares o premolares en el consultorio del Dr. Valeri Paredes.

6.2.1. Criterio de Inclusión de la muestra:

Tabla 3. Criterio Inclusión de la muestra

○ <i>Grupo Experimental</i>	○ <i>Grupo Control</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes asintomáticos y sintomáticos remitidos por el especialista en endodoncia que 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes remitidos a extracción de piezas dentales superiores que no presenten ninguna alteración ni

<p>presenten lesión periapical refractaria a un tratamiento endodóntico.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con tratamiento antibiótico previo. • Pacientes mayores de 18 años. • Pacientes de género masculino y femenino. • Pacientes sin alteraciones inmunológicas. 	<p>lesión periapical y se realice su extracción por motivos ortodónticos, quirúrgicos, entre otros</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con tratamiento antibiótico previo. • Pacientes mayores de 18 años • Pacientes de género masculino y femenino
---	--

6.2.2. Criterio de Exclusión de la muestra

Tabla 4. Criterio Exclusión de la muestra

○ <i>Grupo Experimental</i>	○ <i>Grupo Control</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes sin tratamiento endodóntico previo adecuado. • La pieza dental con lesión periapical refractaria que 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con lesión periapical en la pieza dental de la que se tomará la muestra. • Pacientes con lesión periapical en piezas

<p>presente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Conductos radiculares sin tratar - Enfermedad periodontal - Bolsas periodontales - Fracturas - Restauraciones defectuosas - Caries - fistulas <ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con alteraciones inmunológicas • Pacientes que tomen medicamentos que alteren su respuesta inmunológica. 	<p>adyacentes a la pieza dental de la que se tomará la muestra al momento de extraerla.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Piezas dentales inferiores debido al mayor riesgo de contaminación con saliva durante la toma de muestra. • Pacientes que presenten en la pieza de la cual se tomará la muestra: <ul style="list-style-type: none"> - Caries - Fracturas - Restauraciones defectuosas - Enfermedad periodontal - Pericoronaritis • Pacientes con alteraciones inmunológicas o que presenten enfermedades sistémicas que alteren su sistema inmune. • Pacientes que tomen medicamentos que alteren su respuesta inmunológica.
--	---

6.3. Materiales

A continuación se detallan los materiales que se utilizarán para esta investigación en cada una de sus fases:

Tabla 5. Materiales de la Investigación

Fase Quirúrgica	Fase en Laboratorio
1. Cureta estéril (Maillefer)	Instrumentos: 1. Pipetas (Labnet) 2. Puntas para pipetas (Rainin) 3. Tubos de muestra (Eppendorf) 4. Reactivos (Promega), (Invitrogen)
2. Hisopo estéril (Remel)	5. Congeladora (LG)
3. Tubos de muestra (Eppendorff)	6. Centrifugadora (Eppendorf)
4. Placas Petri (Alfalab)	7. Incubadora (Labnet)
5. Etanol molecular (medio de transporte)	8. Agitador (Sensaur)
	9. Termocicladora (BioRad T100)
	10. Cámara de electroforesis (Fisher Biotec)

	11. Cámara oscura de luz ultravioleta (Kodak)
	12. Tinciones cristal violeta y safranina (BD)
	13. Microscopio (Olympus)

6.4. Toma de muestras

En el momento de realizar la cirugía perirradicular se toma una muestra del tejido infectado periapical, el cual es colocado en un tubo eppendorf con etanol molecular que tiene la cualidad de preservar los tejidos. Este tejido es sometido a un posterior análisis molecular a fin de identificar el ADN bacteriano y otros microorganismos presentes. Simultáneamente a la remoción del tejido perirradicular infectado que es por lo general un quiste o granuloma, se realiza un frotis justamente de la muestra para después hacer la tinción Gram. Por medio de la tinción Gram, se establece si los microorganismos están vivos y qué tipo de microorganismos están presentes en la lesión. Para asociar la presencia de microorganismos a la causalidad de la lesión refractaria, se tomará muestras de tejidos completamente sanos al realizar extracciones de piezas dentales superiores con el fin de comparar la presencia e índice de microorganismos entre el tejido con lesión periapical refractaria al tratamiento endodóntico y el tejido sano el cual será el grupo control. Se ha descrito la siguiente metodología para realizarlo:

Los 55 que pacientes participaron en este estudio divididos de la siguiente forma:

Tabla 6. División de la muestra

○ Grupo experimental	○ Grupo Control
<p>20 pacientes con lesión periapical refractaria al tratamiento endodóntico: consultorio Dr. Valeri Paredes y área de cirugía oral USFQ</p> <p>Se dividirán en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Asintomáticos o sintomáticos 	<p>35 pacientes: consultorio Dr. Valeri Paredes y área de cirugía oral USFQ</p> <p>-Pacientes sin lesión periapical, se tomará la muestra de tejidos sanos provenientes de piezas dentales superiores remitidas a extracción que estén sanas y no posean ningún tipo de infección</p>

I. Protocolo pre quirúrgico para grupo control y experimental

1. Se presenta el consentimiento informado aprobado por el comité de bioética de la USFQ a todos los pacientes participantes. Una vez aprobado se procede a realizar un cuestionario y el protocolo para la toma de muestra.

2. Se realiza un enjuague oral antes del procedimiento quirúrgico con gluconato de clorhexidina al 0.12%;

3. Se realiza la limpieza de la zona quirúrgica antes de realizar la incisión con gaza estéril con gluconato de clorhexidina 0.2%

II. Protocolo Quirúrgico para grupo experimental

1. Se anestesia la zona involucrada de forma regional e infiltrativa

2. Se hace las incisiones correspondientes de acuerdo al diseño del colgajo indicado.

2. Se levanta el colgajo muco-periostico de manera muy cuidadosa en la que no se contamine el campo quirúrgico con saliva y los microorganismos del medio oral.

3. Se expone la lesión periapical

4. Se coloca succión en alta potencia con el fin de evitar la contaminación de la zona de la cual se tomará la muestra.

5. Se evita contacto de la lengua y labios del paciente con el área quirúrgica para evitar la contaminación del medio oral a la lesión.

6. Se toma una muestra de la lesión periapical con una cureta estéril y se coloca la muestra de tejido en un tubo (estéril) con solución de etanol al 70% (grado molecular).

7. Se procede a la resección del ápice afectado y a la remoción de la lesión periapical por medio de curetaje hasta eliminarla por completo.

8. Simultáneamente a la remoción del tejido infectado se realiza un hisopado de la lesión,

con el que se realiza un frotis en un porta-objetos el cual debe ser fijado con calor para la posterior tinción.

9. Se realiza la retrobturación del ápice que fue intervenido con MTA.

10. Se reposiciona el colgajo elevado en su lugar original y se sutura.

11. Se conserva las muestras tomadas de los tejidos enfermos a -20 grados Celsius.

III. Protocolo Quirúrgico para grupo control

1. Se anestesia la zona involucrada de formar regional e infiltrativa

2. Se procede a la extracción de la pieza dental con la técnica quirúrgica de acuerdo al caso presentado.

4. Se coloca succión alta potencia con el fin de evitar la contaminación de la zona de la cual se tomará la muestra.

5. Se evita contacto de la lengua y labios del paciente con el área quirúrgica para evitar la contaminación del medio oral.

6. Simultáneamente a la extracción se realiza un hisopado del alveolo y con el mismo se realiza un frotis en un porta-objetos el cual debe ser fijado con calor para la posterior tinción.

7. Se toma la muestra del tejido sano que rodea a la raíz del diente que fue extraído sin ser contaminado con el medio oral

8. Se coloca la muestra de tejido en un tubo (estéril) con solución de etanol al 70% (grado molecular).

9. Se conserva la muestra de tejido sano a -20 grados Celsius.

IV. Protocolo Post-Quirúrgico en el laboratorio para grupo control y experimental

1. Se realiza la tinción Gram del frotis de cada muestra.
2. Se observa con el microscopio la tinción Gram en los porta-objetos pertenecientes a cada muestra, se divide cada muestra en 50 campos de observación y se realiza un conteo de la presencia de microorganismos en cada campo. El conteo se realizó en base a los siguientes parámetros:
 - Presencia de Microorganismos
 - Cocos Gram +
 - Cocos Gram –
 - Bacilos Gram +
 - Bacilos Gram –
 - Levaduras
 - Ausencia de Microorganismos
3. Se procede a la extracción de ácidos nucleicos (ADN) contenidos en la muestra de tejido por medio de la técnica CTAB.
4. Se realiza la cuantificación de ácidos nucleicos.
5. Se realiza la identificación molecular de ADN, ADN bacteriano y ADN de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* presente en las muestras a través de la amplificación de genes específicos correspondientes a lo mencionado con protocolos de Reacción en Cadena de la Polimerasa conocido como PCR. La

selección de los microorganismos para ser identificados en este estudio se basó en los siguientes criterios:

- Factores de virulencia y patogenicidad que presenta el microorganismo.
 - Número de estudios que asocian al microorganismo con la persistencia de la periodontitis apical y el fracaso endodóntico.
 - Porcentaje del microorganismo encontrado en los estudios realizados.
6. Los productos de amplificación se someten a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer 1X TBE y 0.5mg/mL de bromuro de etidio para ser fotografiados en un fotodocumentador de luz UV y posteriormente visualizar las bandas.

V. Análisis de Datos

Se analizan los resultados entre los diferentes parámetros clínicos involucrados y la frecuencia de microorganismos presentes en las muestras por medio de asociaciones con el análisis OR (odds ratio), Prueba T y Prueba exacta de Fisher. $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los programas de estadística utilizados fueron Epiinfo y SPSS.

En la siguiente tabla se exponen los primers para PCR utilizados para la identificación de ADN y microorganismos presentes en las lesiones periapicales refractarias:

Tabla 7. Primers utilizados para identificar ADN de microorganismos seleccionados en el estudio

Primer Pair o Micoorganismo	Secuencia (5' a 3')	Amplicón (bp)
Beta Actina	F: CGG AAC CGC TCA TTG CC R: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	297
16S Universal ^a (Bacteriano)	27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 1429R: GGT TAC CTT GTT ACG ACTT	1,500
<i>Candida albicans</i> ^a	F: GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G R: CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC	158
<i>Enterococcus faecalis</i> ^b	F: GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG R: CCG TCA GGG GAC GTT CAG	310

^a Primers utilizados en el estudio de Siqueira y Rocas (2005)

^b Primers utilizados en el estudio de Fouad et al (2002)

A continuación se detallan las concentraciones de los reactivos y condiciones utilizadas para realizar el PCR y amplificar los genes para Beta actina, 16s, *Cándida albicans* y *Enterococcus faecalis*:

Tabla 8. Volumen y concentración utilizada para PCR beta-Actina

PCR BETA ACTINA		
Concentración Stock	Concentración Final	Volumen 1 rxn (25 μ l)
H2O		6,7 μ l
BUFFER 5X	1 X	4 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM	1.2 μ l
dNTPs 2 mM	0.2 mM	2 μ l
Primer F 10 μ M	1 μM	2 μ l
Primer R 10 μ M	1 μM	2 μ l
Taq 5 U	0.50 U	0,1 μ l
ADN		7,5 μ l

Tabla 9. Condiciones para PCR beta-Actina

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
94	2:00	
92	0:50	X 35
45	0:50	
72	0:50	
72	2:00	

Tabla 10. Volumen y concentración utilizada para PCR 16s

PCR 16 S		
Concentración Stock	Concentración Final	Volumen 1 rxn (25 μ l)
H ₂ O		12,88 μ l
BUFFER Promega 5X	1 X	2,5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM	2,2 μ l
dNTPs 2 mM	0.25 mM	1,5 μ l
Primer 27F 10 μ M	0.2 μ M	0,4 μ l
Primer 1429 R 10 μ M	0.2 μ M	0,4 μ l
Taq 5 U	2,5 U	0,12 μ l
ADN		7, 5 μ l

Tabla 11. Condiciones para PCR 16s

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
94	4:00	
94	1:00	X 30
57	0:30	
72	2:00	
72	8:00	

Tabla 12. Volumen y concentración utilizada para *Candida albicans*

PCR <i>Candida albicans</i>		
Concentración Stock	Concentración Final	Volumen 1 rxn (25 μ l)
H2O PCR		7,25 μ l
BUFFER Promega 5X	1 X	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM	1,5 μ l
dNTPs 2 mM	0.2 mM	2,5 μ l
Primer F	0.2 μM	0,5 μ l
Primer R	0.2 μM	0,5 μ l
Taq 5 U	1,25 U	0,25 μ l
ADN		7,5 μ l

Tabla 13. Condiciones para PCR *Candida albicans*

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
95	3:00	
95	0:30	X 35
59	0:30	
57	0:30	
72	10:00	

Tabla 14. Volumen y concentración utilizada para *Enterococcus faecalis*

PCR <i>Enterococcus faecalis</i>		
Concentración Stock	Concentración Final	Volumen 1 rxn (25 μ l)
H ₂ O PCR		9,3 μ l
BUFFER Promega 5X	1 X	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM	1,5 μ l
dNTPs 2 mM	0.2 mM	2,5 μ l
Primer F	0.2 μM	0,8 μ l
Primer R	0.2 μM	0,8 μ l
Taq 5 U	1,25 U	0,125 μ l
ADN		5 μ l

Tabla 15. Condiciones para PCR *Enterococcus faecalis*

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
95	3:00	
95	0:30	X 25
59	0:30	
57	0:30	
72	10:00	

7. RESULTADOS

En este estudio participaron 55 pacientes, el grupo experimental estuvo conformado por 20 pacientes que presentaron periodontitis periapical refractaria al tratamiento endodóntico y el grupo control estuvo conformado por 35 pacientes que fueron sometidos a extracción de piezas saludables.

De los 20 pacientes con enfermedad, 16 (80%) fueron de género femenino y 4 (20%) fueron de género masculino (Tabla 16). En cuanto a la presencia de síntomas como consecuencia de la periodontitis periapical refractaria, 6 (30%) de ellos fueron sintomáticos y 14 (70%) fueron asintomáticos (Tabla 18). Los 20 (100%) pacientes de este grupo recibieron sultamicilina antes de la cirugía periapical, de los cuales 6 (30%) la tomaron de forma profiláctica y 14 (70%) recibió una dosis por un tiempo igual o mayor a 24 horas previa a la cirugía (Tabla 16.).

De los 35 pacientes correspondientes al grupo control, 18 (51.4%) fueron de género femenino y 17 (48.6%) fueron de género masculino. En este grupo ningún paciente presentó síntomas previo a la extracción de la pieza dental ya que se trataba de piezas totalmente sanas sin ninguna alteración. En cuanto a la administración de sultamicilina como antibiótico previo a la extracción, 6 (17.1%) no recibió ninguna dosis, 17 (48.5%) recibió profilaxis antibiótica y 12 (34%) recibió una dosis por un tiempo igual o mayor a 24 horas (Tabla 19).

La observación de la tinción Gram de 50 campos por muestra, es decir 1000 campos en el grupo experimental y 1750 campos en el grupo control dio los siguientes resultados: En las muestras de tejidos con periodontitis periapical refractaria se observó presencia de microorganismos en 539 campos de 1000 es decir el 54%, de los cuales 104 campos

(10%) revelaron la presencia de cocos Gram -, 504 campos (50%) de cocos Gram +, 5 campos (1%) de bacilos Gram -, 129 campos (13%) de bacilos Gram + y un campo (0.1%) de levaduras. De las 20 muestras observadas pertenecientes al grupo experimental, 16 (80%) reveló presencia de microorganismos en la tinción, mientras que 4 (20%) no presentó evidencia de ningún microorganismo. La presencia de cocos Gram + fue observada en 16 muestras lo que equivale al (80%), se encontraron cocos Gram - en 14 de las muestras (70%), bacilos Gram - en 3 (15%) de las muestras, bacilos Gram + en 13 (65%) de las muestras y levaduras en 1 (5%) de las muestras (Tabla 17). Por otro lado en las muestras de tejido sano pertenecientes al grupo control, se observó la presencia de microorganismos en 4 campos de 1750 es decir el 0,23%, de los cuales 3 campos (0,3%) mostraron la presencia de coco Gram + y 1 campo (0,1%) de cocos Gram -. De las 35 muestras observadas pertenecientes a este grupo, solo la muestra SPE31 reveló presencia de microorganismos, es decir 1 de 35 lo que equivale al 3% (Tabla 20).

En el análisis molecular del ADN, en 55 muestras recolectadas se realizó la amplificación de beta-Actina para corroborar la presencia de ADN en los tejidos tanto sanos como enfermos, el 100% de las muestras dieron como resultado beta-Actina positivo en la electroforesis. Consiguientemente se realizó el PCR para la amplificación del gen 16s el cual determina la presencia de ADN bacteriano en los tejidos. En el grupo experimental 16 (80%) de las muestras SPE1, SPE2, SPE3, SPE4, SPE5, SPE6, SPE8, SPE9, SPE10, SPE11, SPE12, SPE14, SPE16, SPE18, SPE19 Y SPE20 dieron positivo mientras que en el grupo control una muestra SPE31 (3%) dio positivo para esta amplificación (Tablas 18 y 21).

Se realizó posteriormente el PCR para la amplificación del gen correspondiente a la bacteria *Enterococcus faecalis* en todas las muestras que dieron positivo en el 16s, de las cuales SPE2, SPE 9 y SPE12 es decir 3 muestras o el 15% correspondientes al grupo experimental dieron positivo. La única muestra que dio positivo para el 16s del grupo control SPE31 dio resultado negativo para la amplificación del gen de esta bacteria (Tablas 18 y 21).

Se procedió después a realizar el PCR para la amplificación del gen perteneciente a *Candida albicans* en las 55 muestras de tejidos sanos y enfermos. En el grupo experimental, las 4 muestras SPE5, SPE11, SPE12 Y SPE16 o 20% dieron positivo para esta amplificación mientras que en el grupo control 0% de las muestras presentaron resultados positivos para *Candida albicans* (Tablas 18 y 21).

En cuanto al número de tipo de microorganismos identificados en cada muestra. En el grupo experimental se estableció que 4 (20%) correspondiente a las muestras SPE7, SPE13, SPE15 y SPE17 no presentó microbiota, 4 o 20% correspondientes a las muestras SPE2, SPE9, SPE18 y SPE20 presentó dos tipos de microorganismos, 8 o 40% de las muestras SPE1, SPE3, SPE4, SPE5, SPE6, SPE8, SPE10 y SPE19 presentó 3 tipos de microorganismos, 2 o 10% correspondiente a las muestras SPE12 y SPE14 presentó 4 tipos de microorganismos y 2 o 10% de las muestras SPE11 y SPE16 reveló 5 tipos de microorganismos. Por otro lado el grupo control presentó en una única muestra (3%) correspondiente a SPE31, 2 tipos de microorganismos (Tabla 22).

Los resultados obtenidos en base al análisis OR fueron los siguientes: se determinó que la presencia bacteriana en los tejidos perirradiculares aumenta la probabilidad o riesgo en 136 veces de desarrollar la persistencia de la lesión perirradicular ($p < 0.05$) (OR=136)

(IC95%=14,6-317), siendo estadísticamente significativo. En cuanto al OR de microorganismos específicos asociados a la persistencia de la lesión se estableció que la presencia de *C. albicans* en los tejidos aumenta en 19.36 veces la probabilidad ($p<0.05$) (OR=19.36), la presencia de *E. faecalis* aumenta en 14.22 veces la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad ($p=0.043$) (OR=14.22), consiguientemente la presencia de cocos Gram + incrementa en 136 la probabilidad ($p<0.05$) (OR=136), de cocos Gram – aumenta la probabilidad en 79 veces ($p<0.05$) (OR=79), de bacilos Gram + aumenta la probabilidad en 127.8 veces ($p<0.05$) (OR=1127.8) y de bacilos Gram – incrementa en 14.22 veces la probabilidad ($P=0.043$)(OR=14.22) de desarrollar la periodontitis perirradicular refractaria. Siendo $P<0.05$ en todos los casos mencionados, hace que sean estadísticamente significativos. Se asoció también que la probabilidad de que los tejidos sanos presenten microorganismos es de 0.0074 veces ($p<0.05$) (OR=0.0074) (IC95%=0.0008-0.0712) lo cual también es estadísticamente significativo (Tabla 22, 23). Adicionalmente, se realizó el análisis OR para asociar la presencia bacteriana en pacientes sintomáticos del grupo experimental. Se determinó que la presencia bacteriana determinada por el 16 S positivo en los tejidos perirradiculares aumenta la probabilidad en 2 veces para que los pacientes presenten síntomas ($p=0.51$) (OR=2) (IC95%= 0.12-22,95), lo cual no fue estadísticamente significativo. Adicionalmente se realizó un análisis OR para la asociación de los microorganismos identificados con la manifestación de síntomas en los pacientes. La presencia de *C. albicans* aumentó en 0.733 veces la probabilidad ($p=0.65$) (OR=0.733) (IC95%= 0.06-8.9) de presentar síntomas, de *E. faecalis* aumentó en 6.5 veces la probabilidad ($p=0.201$) (OR=6.5) (IC95%= 0.46-91.9) para desarrollar síntomas, de cocos Gram + aumentó en 1.36 veces la probabilidad ($p=0.0657$) (OR=1.36) (IC95%=0.11-16.57), de cocos Gram – aumentó en 0.27 veces la probabilidad ($p=0.0225$)

(OR=0.27) (IC95%=0.035-211), de bacilos Gram + aumentó en 1.11 veces la probabilidad (p=0.66) (OR=1.11) (IC95%= 0.14-8.36) y de bacilos Gram – aumentó en 1.2 veces la probabilidad (p=0.68) (OR=1.2) (IC95%= 0.082-16.4). De los valores de p mencionados todos fueron mayores a 0.05 por lo que no fueron estadísticamente significativos (Tabla 22, 23).

Se asoció de la misma manera la presencia bacteriana con la dosis antibiótica que recibieron los pacientes previo a la intervención quirúrgica. En este análisis se determinó que los pacientes con profilaxis antibiótica presentan 1.36 veces más probabilidad de presentar microorganismos en los tejidos perirradiculares enfermos que los pacientes que recibieron una dosis igual o mayor a 24 horas, sin embargo (P=0.65) (OR=1.36) (IC95%= 0.11-16.57) por lo que esta asociación no fue estadísticamente significativa (Tabla 23).

Se calculó la media de tipo de microorganismos identificados en entre las muestras de tejido enfermo y sano. El promedio en tejidos sanos fue 2.5 y en tejido sano fue 0.057 lo cual analizado con la prueba T presentó (P=0.000001) siendo estadísticamente significativo. Se calculó también la media de tipo de microorganismos entre las muestras de pacientes asintomáticos y sintomático, la cual fue 2,53 y 2,47 respectivamente. P=0.7 por lo que no fue estadísticamente significativo (Tabla 25 y 26).

Además se calculó la sensibilidad especificidad de los métodos realizados en este estudio para identificar la presencia de microbiota, en cuanto a la presencia bacteriana reconocida en la tinción Gram y en el análisis molecular por medio de PCR, se estableció una sensibilidad de 80% y especificidad del 97%. Por otro lado al comparar la identificación de levaduras por medio de la tinción Gram y el análisis molecular de *C. albicans* se estableció 5% de sensibilidad y 100% de especificidad (Tabla 27).

7.1. Gráficos de las electroforesis más representativas del estudio, se presentan los resultados de muestras del grupo experimental y grupo control. L: Ladder (+) : control positivo, (-) : control negativo y pb: número de pares de bases

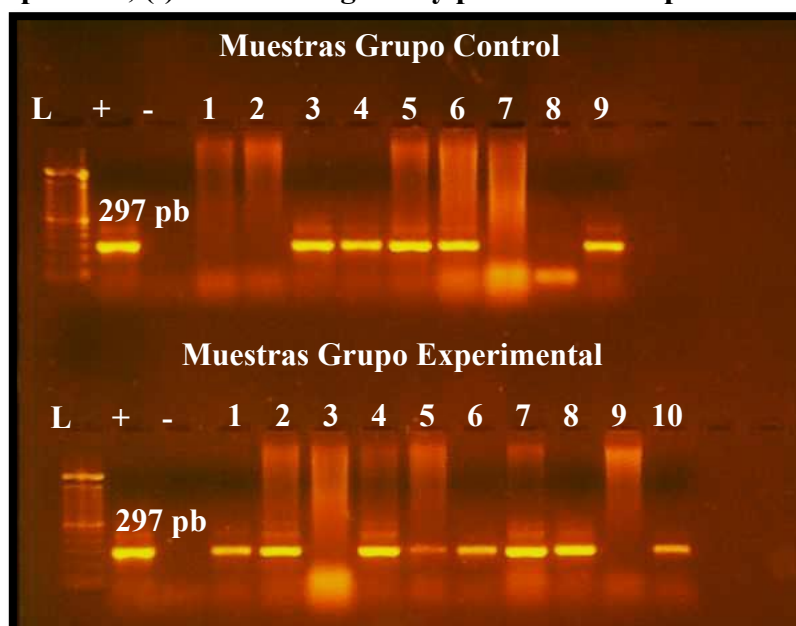


Gráfico 1. Electroforesis b-Actina (297 pares de bases) muestras positivas en GC 3 4, 5, 6, 9 y en GE1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10



Gráfico 2. Beta-Actina Grupo control muestras positivas en GC 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34

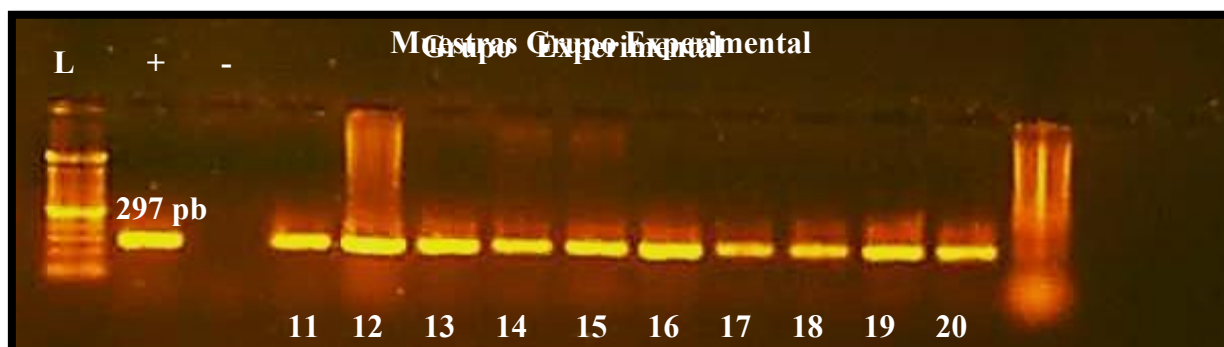


Gráfico 3. B-actina grupo experimental, muestras positivas en GE 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20

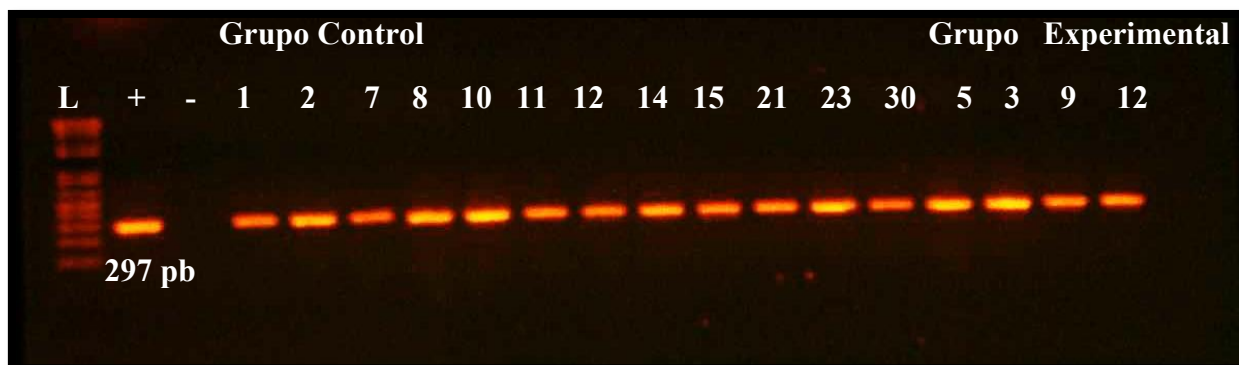


Gráfico 4. B-actina muestras diluidas del grupo control, positivas GC 1, 2, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 30 y grupo experimental positivas GE 5, 3, 9, 12



Gráfico 5. Grupo control resultados negativos de muestras GC 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 para 16 s (1500 pares de bases)

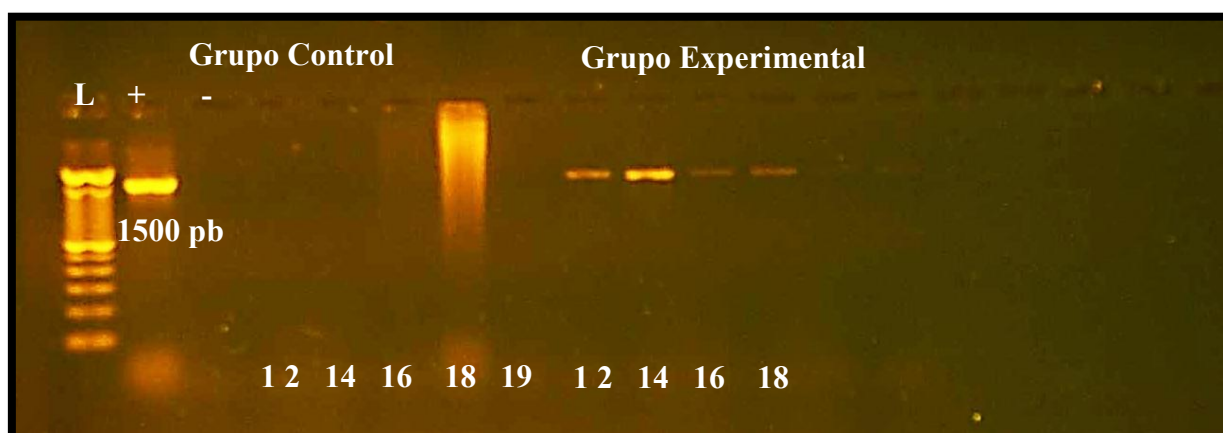


Gráfico 6. Grupo control y experimental resultados positivos en muestras GE12, 14, 16, 18, 19 y negativos en muestras GC12, 14, 16, 18 para el 16 s

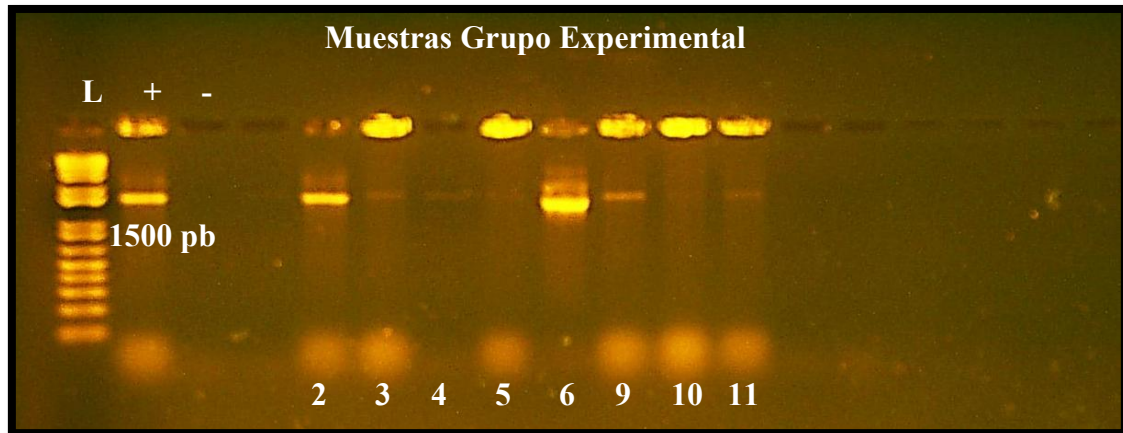


Gráfico 7. Grupo experimental resultados positivos en muestras GE2, 3, 4, 5, 6, 9, 11 para 16 s

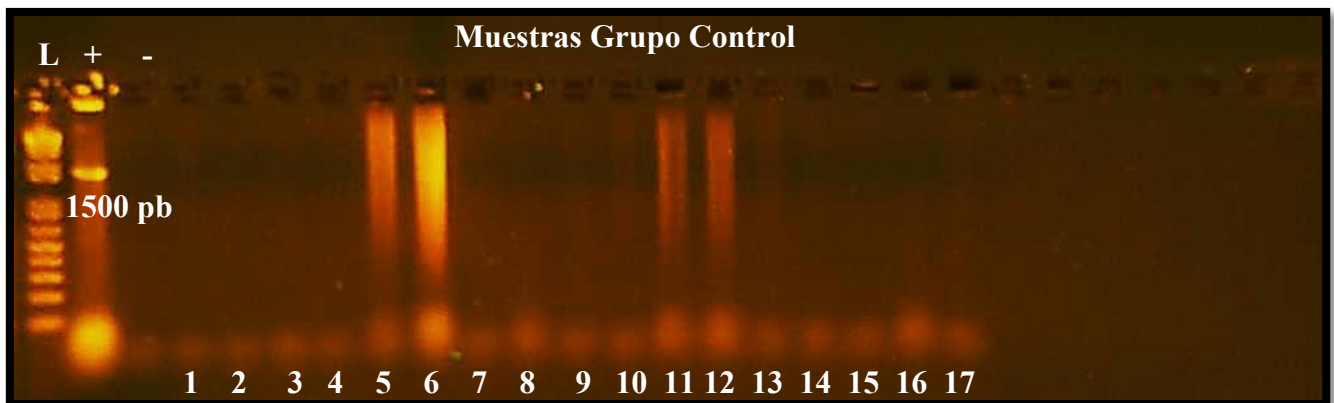


Gráfico 9. Grupo Control, resultados negativos de muestras GC1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 para 16 s

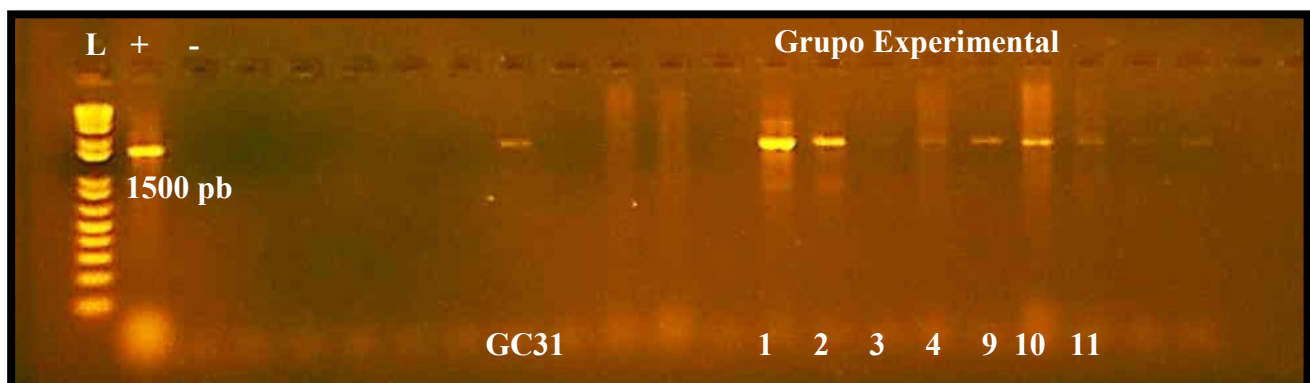


Gráfico 8. Grupo control muestra GC31 única positiva para 16 s y Grupo experimental muestras GE 1,2,3,4,9, 10, 11 positivas para 16 s

7.1. Imágenes de la Tinción Gram: ausencia y presencia de microorganismos pertenecientes al grupo experimental, se muestran los campos más relevantes de los #1000 observados siendo #50 campos por cada muestra.

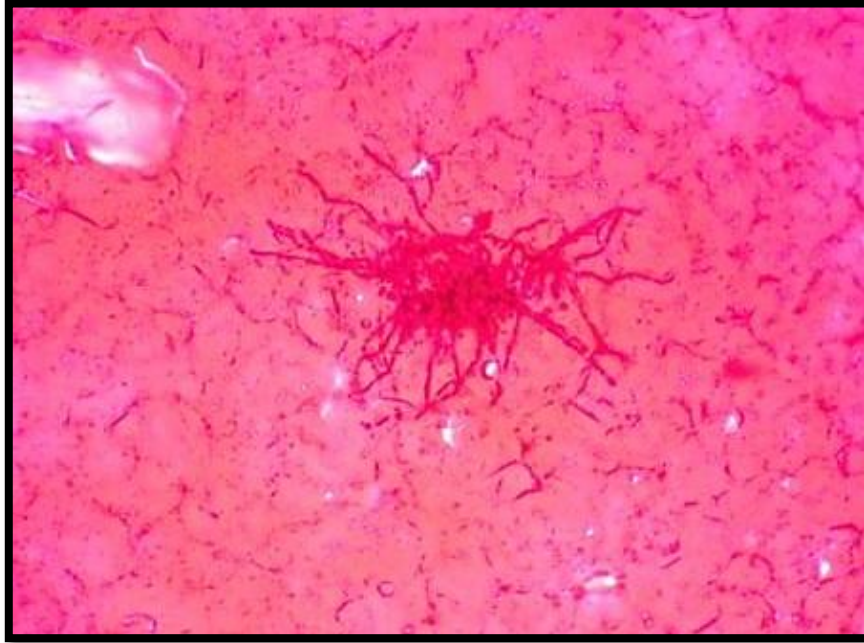


Imagen 1. SPE#11 grupo experimental, campo #4: presencia de bacilos Gram –

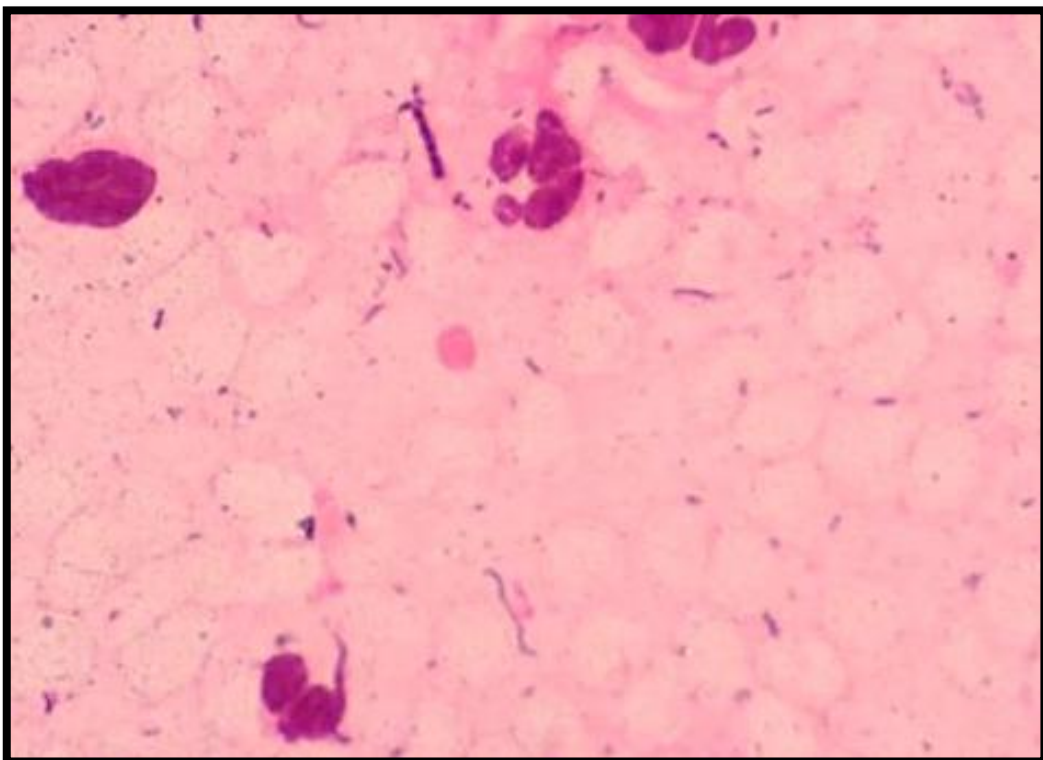


Imagen 2. SPE#8 grupo experimental, campo #8: presencia cocos Gram + y bacilos Gram +

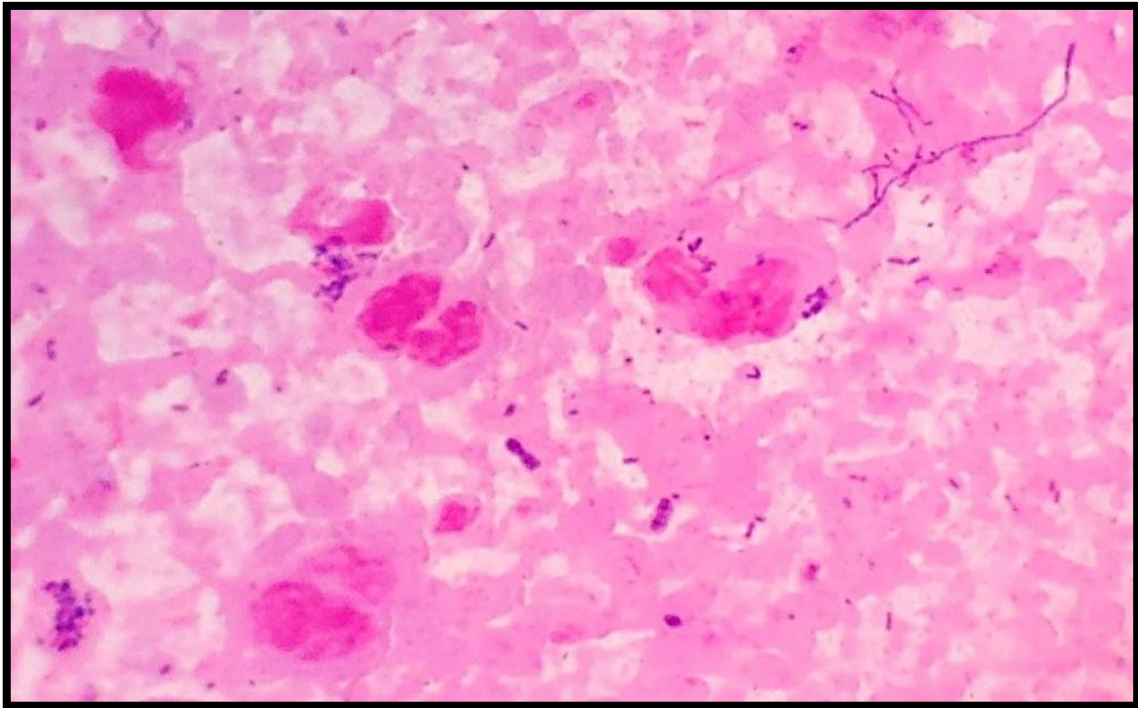


Imagen 3. SPE#2 grupo experimental, campo #3: presencia de bacilos Gram +, cocos Gram + y cocos Gram -

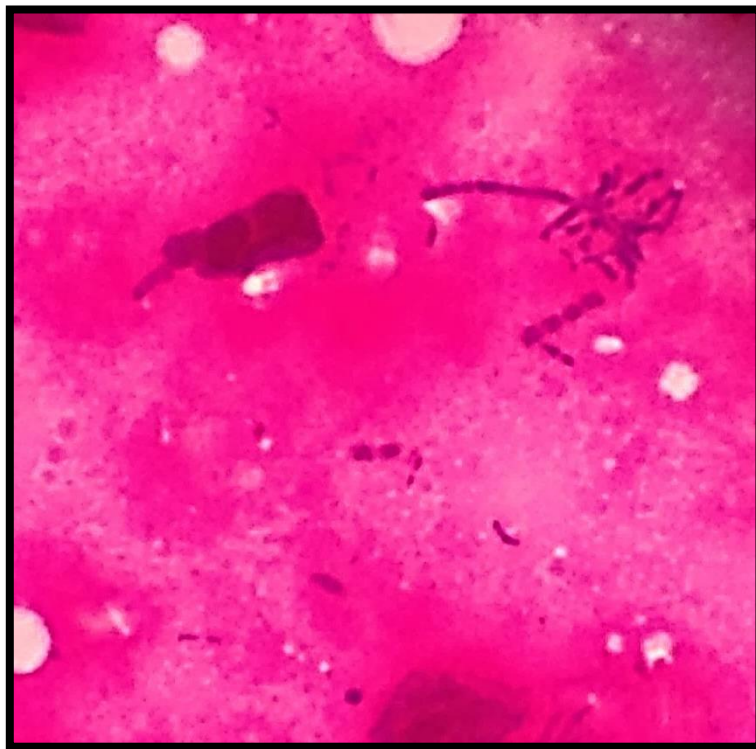


Imagen 4. Magnificación de SPE#6 grupo experimental, campo #3: presencia de cocos Gram + y Bacilos Gram +

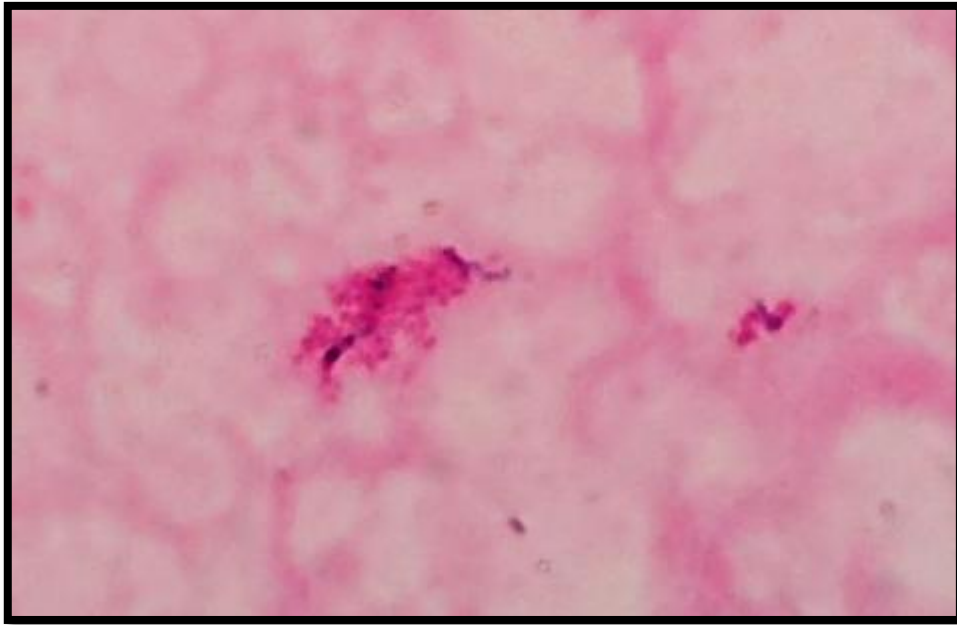


Imagen 5. Magnificación de SPE#5 grupo experimental, campo #30: presencia de cocos Gram + y cocos Gram -

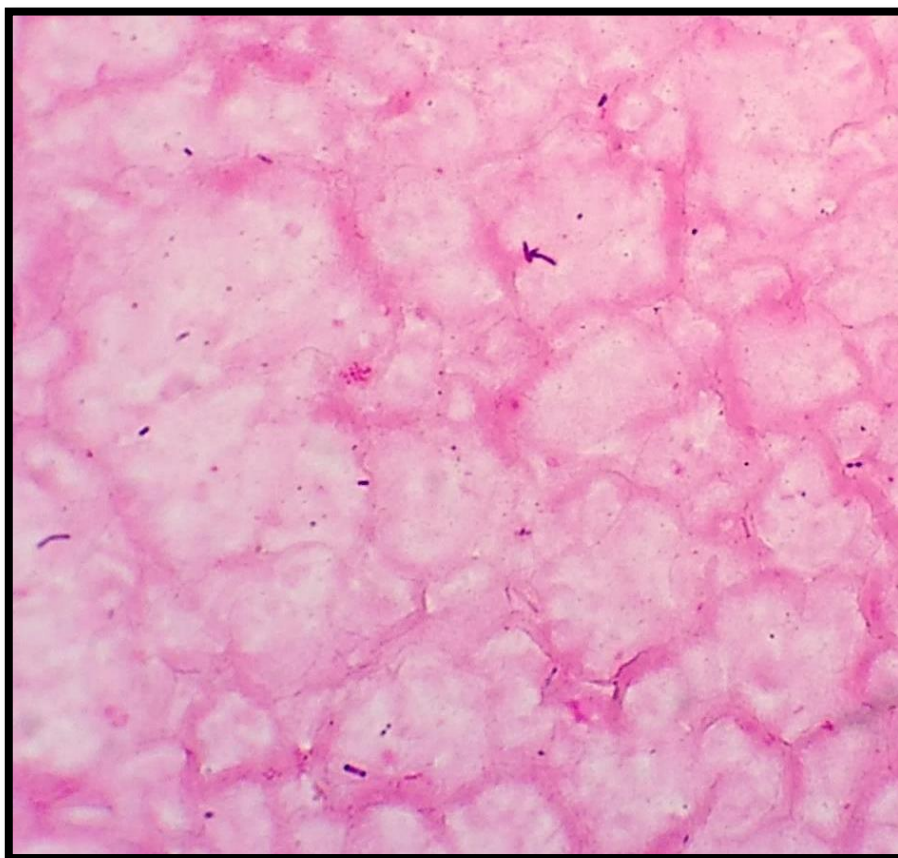


Imagen 6. SPE#10 grupo experimental, campo #40: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

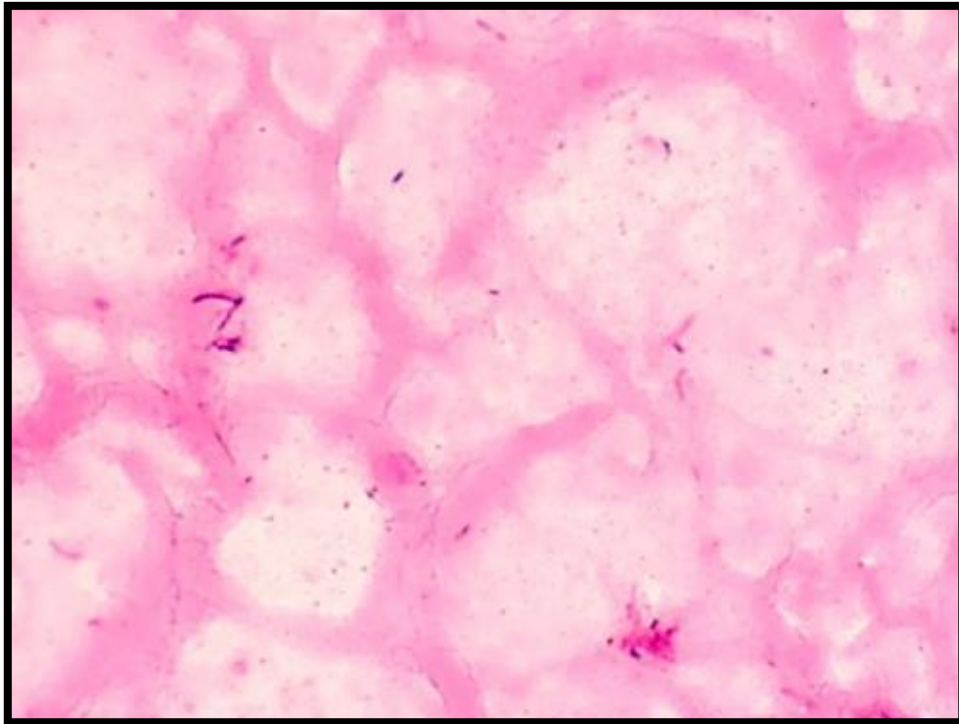


Imagen 7. SPE#16 grupo experimental, campo #38: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram + y bacilos Gram -

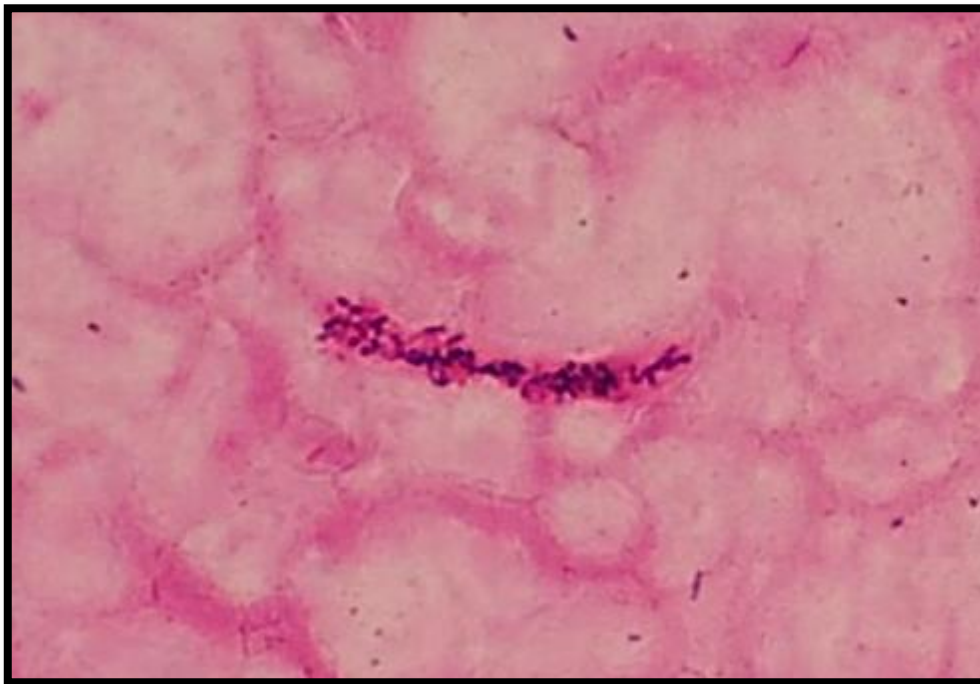


Imagen 8. Magnificación SPE#11 grupo experimental, campo #50: presencia de cocos Gram +, cocos Gram -

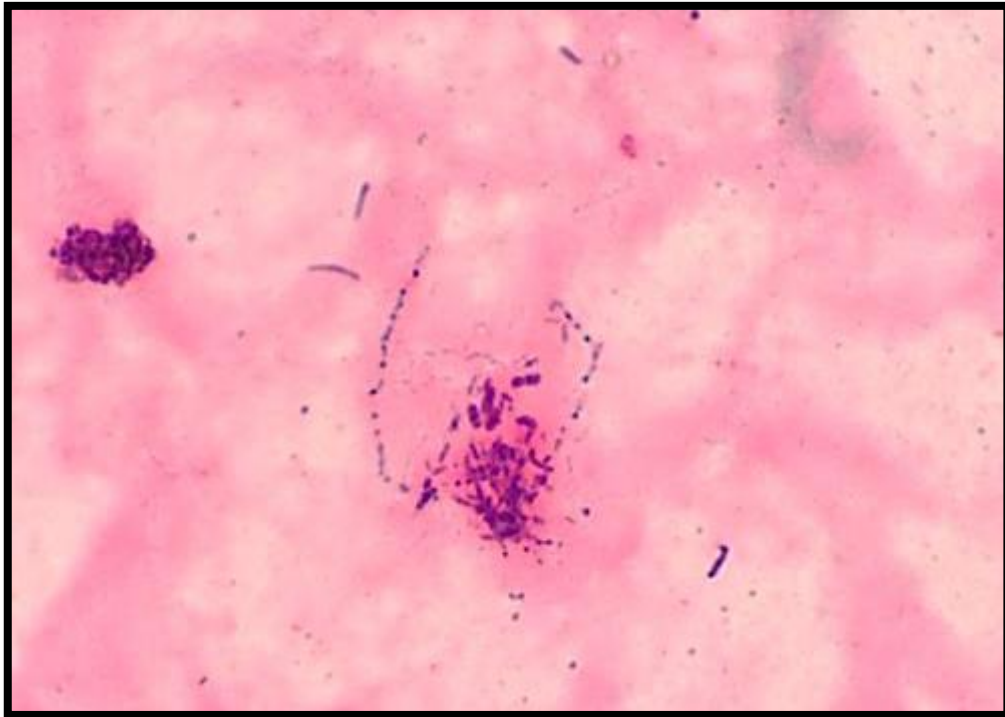


Imagen 9. SPE#14 grupo experimental, campo #44: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

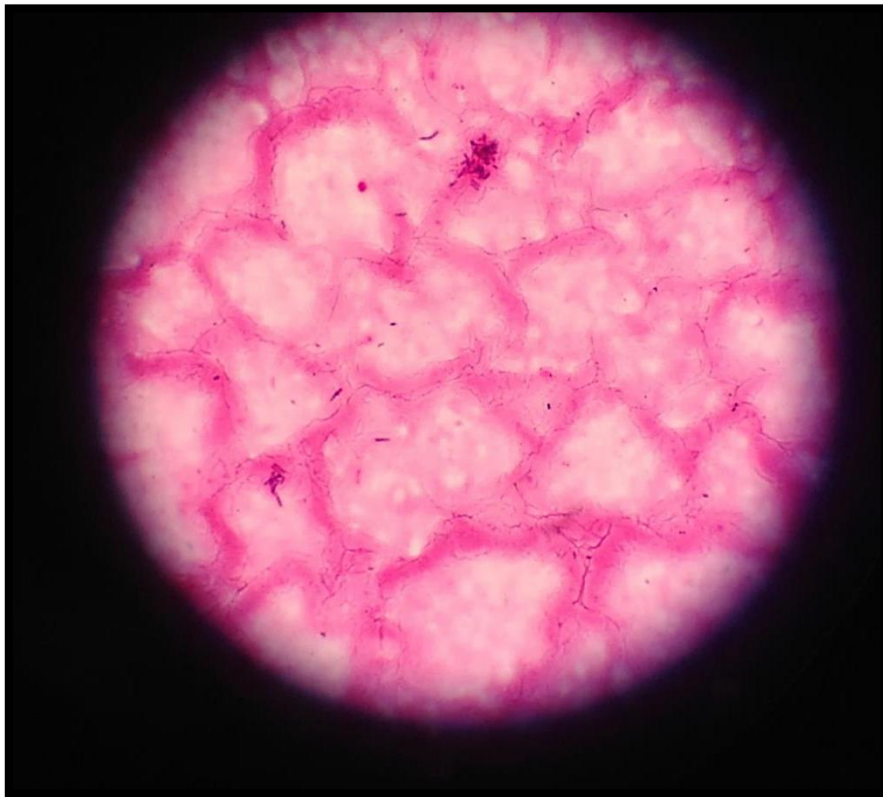


Imagen 10. SPE#19 grupo experimental, campo #46: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

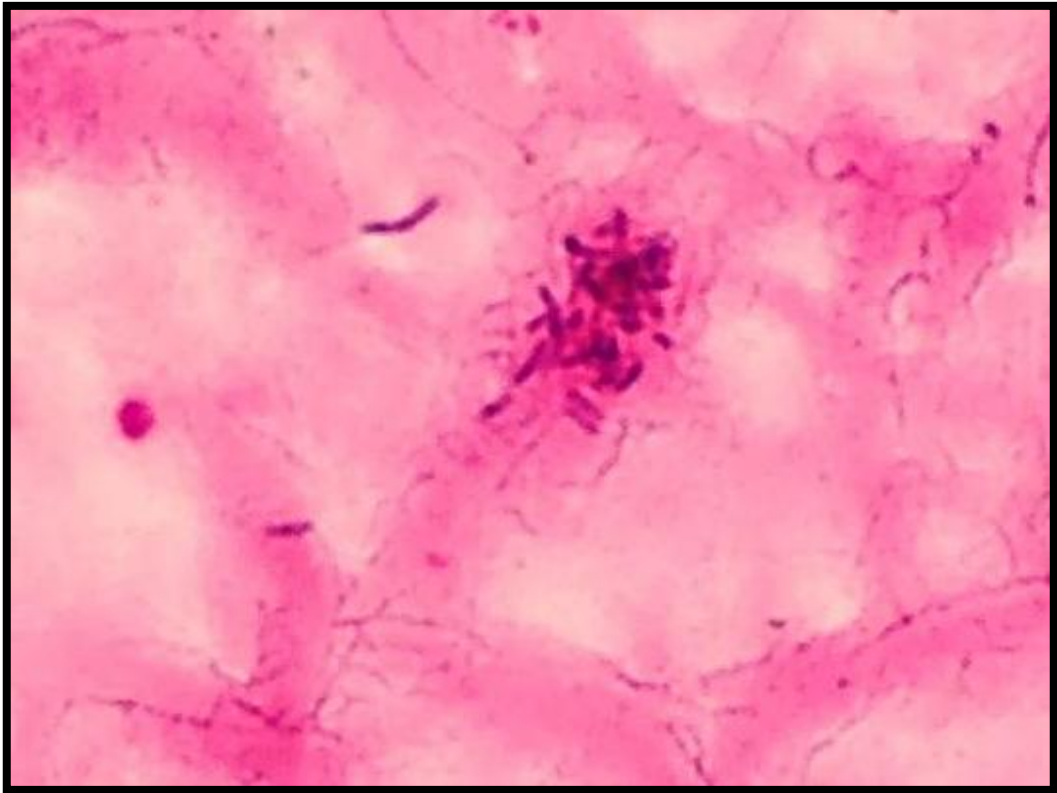


Imagen 11. Magnificación SPE#19 grupo experimental, campo #46: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

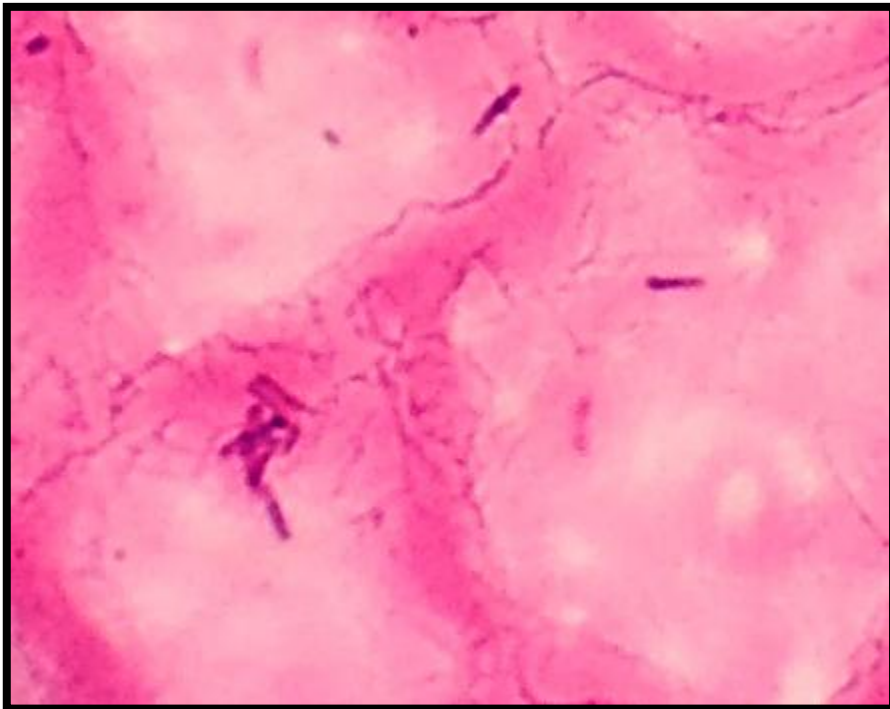


Imagen 12. SPE#19 grupo experimental, campo #46: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

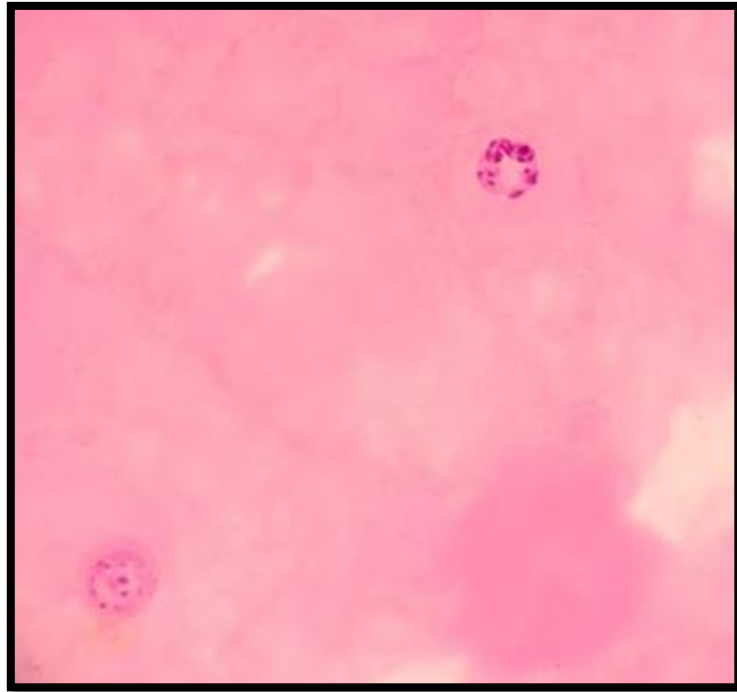


Imagen 13. SPE#7 grupo experimental, campo #34, ausencia de microorganismos en todos los campos

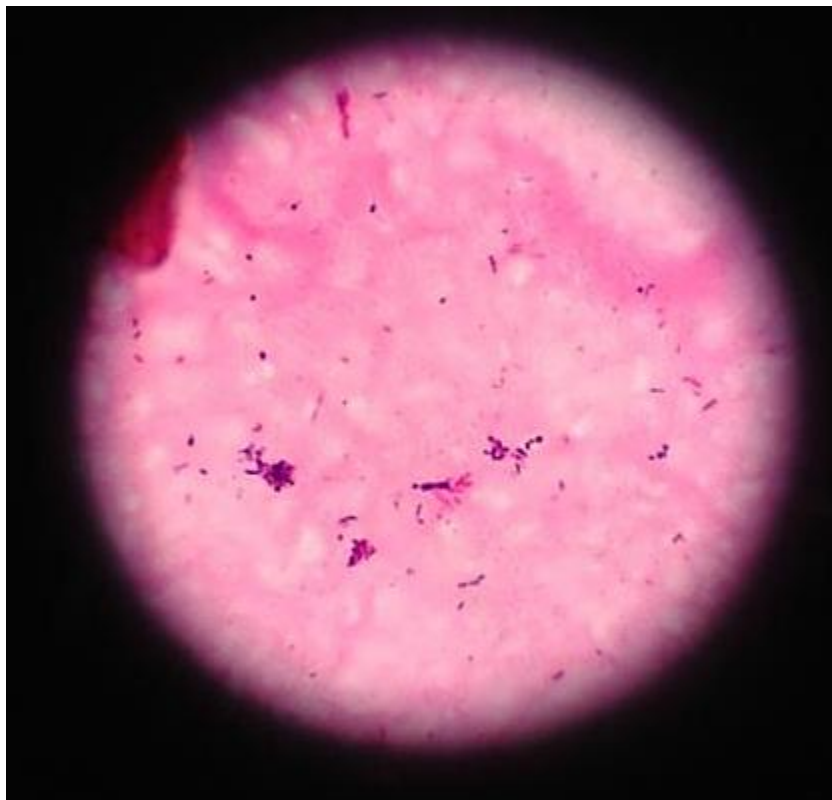


Imagen 14. SPE#14 grupo experimental, campo #46: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram -

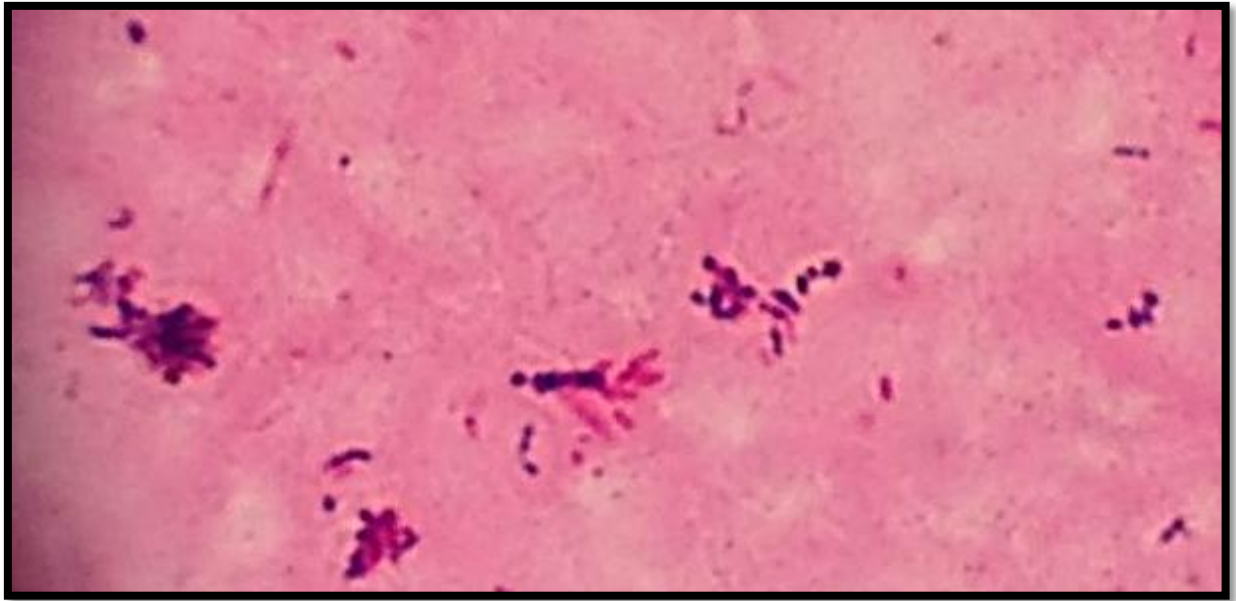


Imagen 15. Magnificación SPE#14 grupo experimental, campo #46: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram –

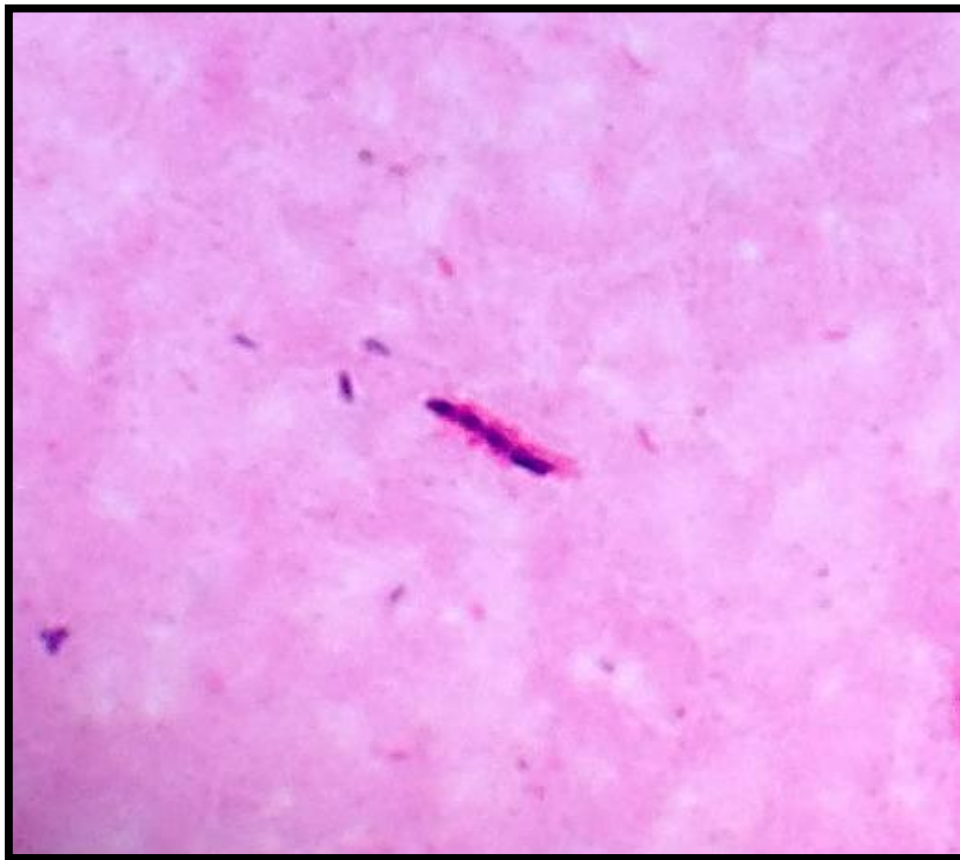


Imagen 16. Magnificación SPE#12 grupo experimental, campo #28: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

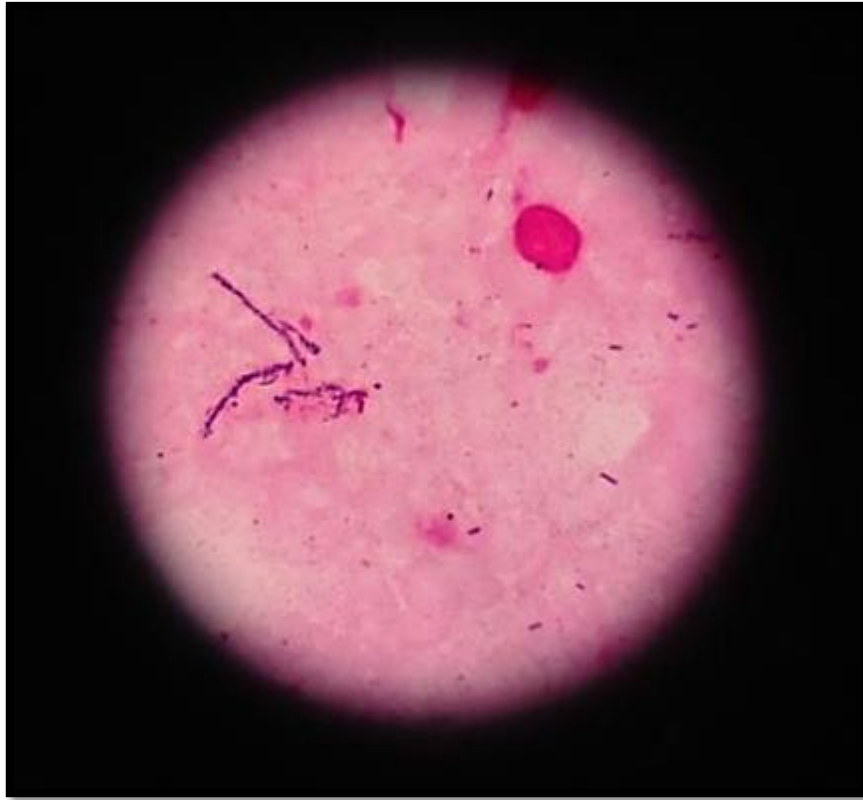


Imagen 17. SPE#16 grupo experimental, campo #23: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +



Imagen 18. Magnificación SPE#16 grupo experimental, campo #23: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram + (Actinomyces)

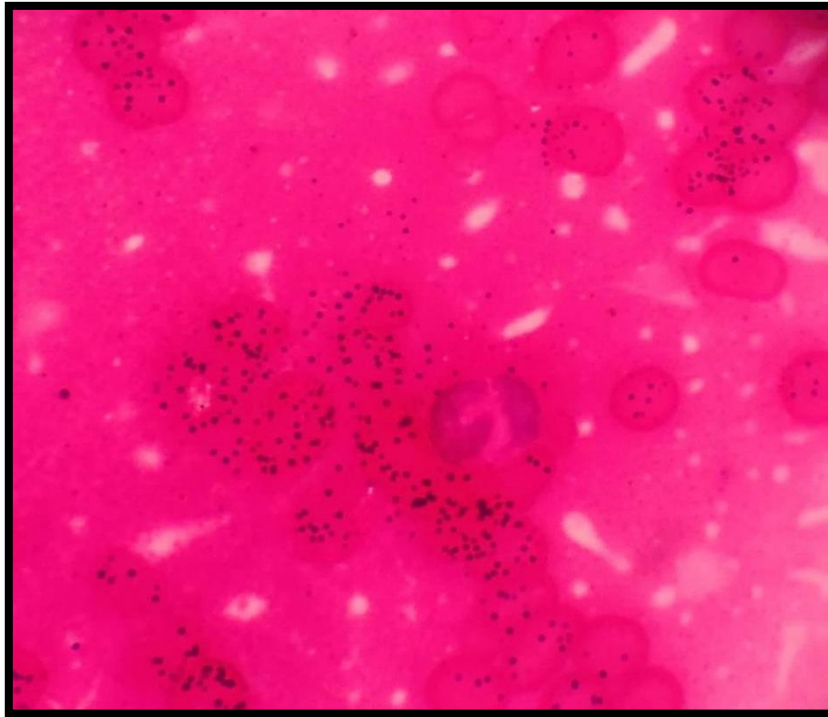


Imagen 19. SPE#13 grupo experimental, campo #34, ausencia de microorganismos, presenta artefacto en la tinción que sugiere que se provocó por el pus en el momento de realizar el frotis

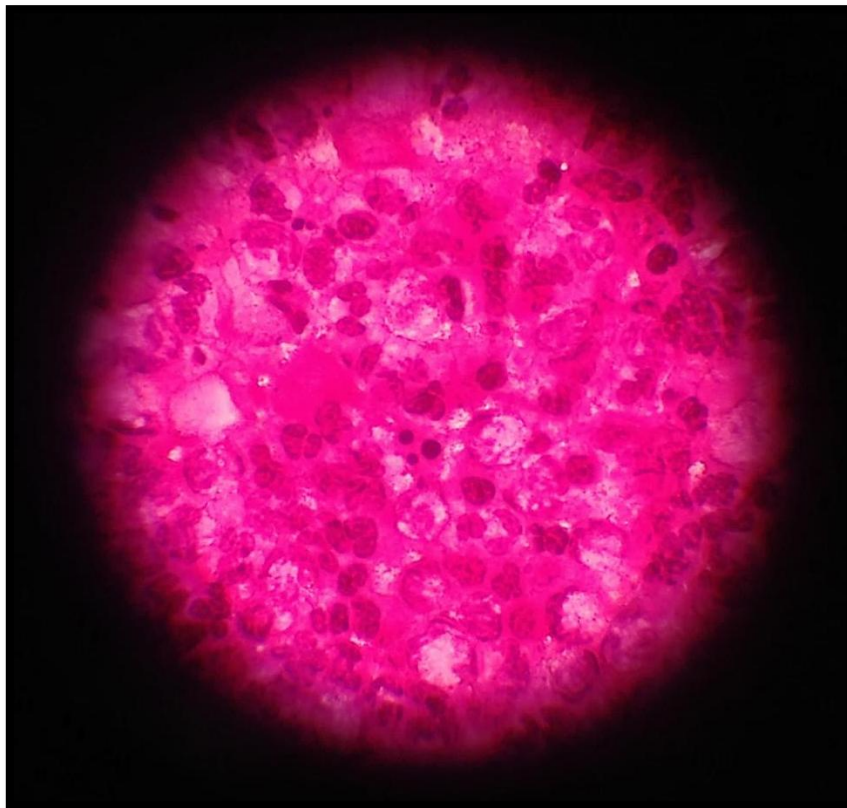


Imagen 21. SPE#17 grupo experimental, campo #18: ausencia de microorganismos

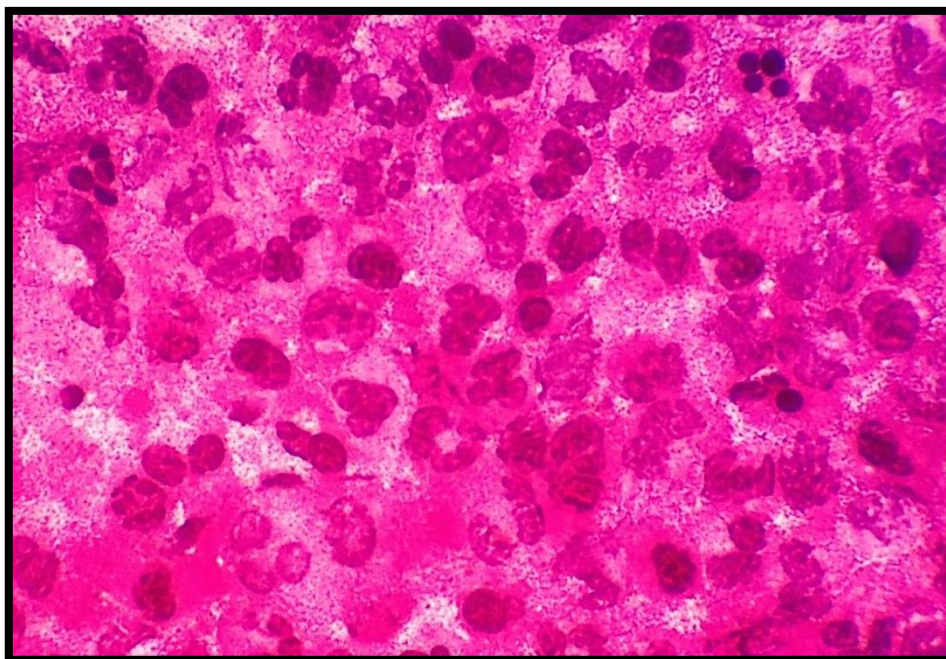


Imagen 22. Magnificación SPE#17 grupo experimental, campo #18: ausencia de microorganismos, presencia varios polimorfo nucleares PMN

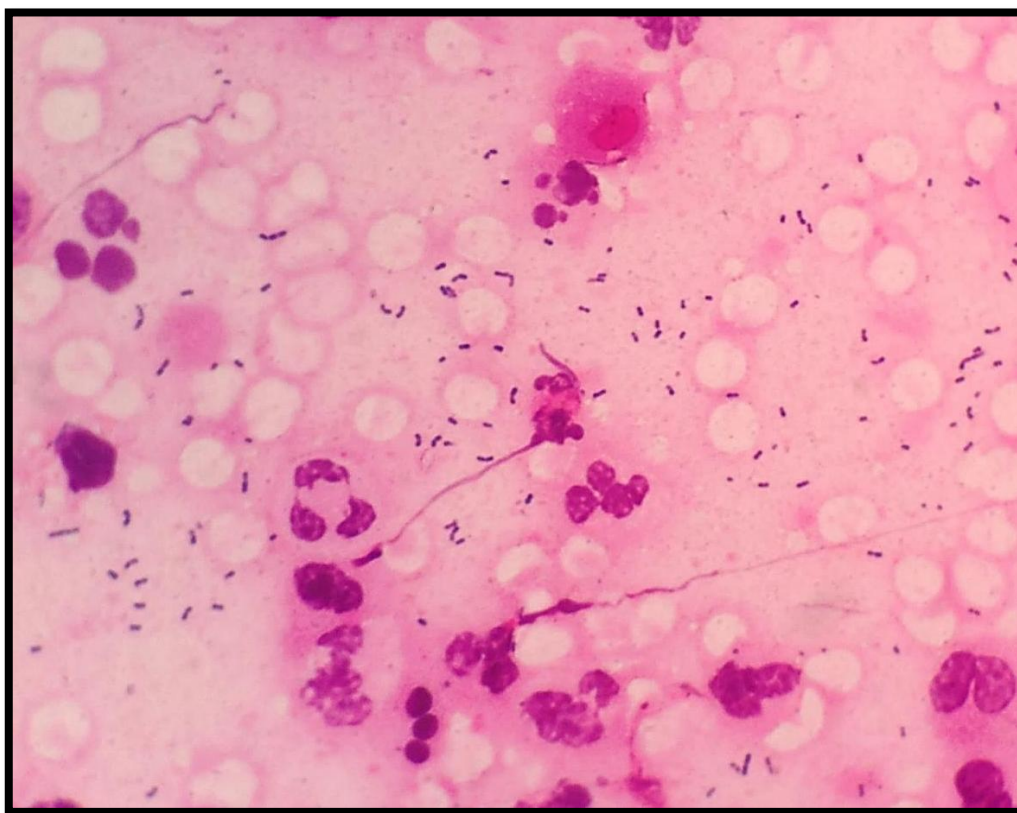


Imagen 23. SPE#20 grupo experimental, campo #18: presencia cocos Gram +

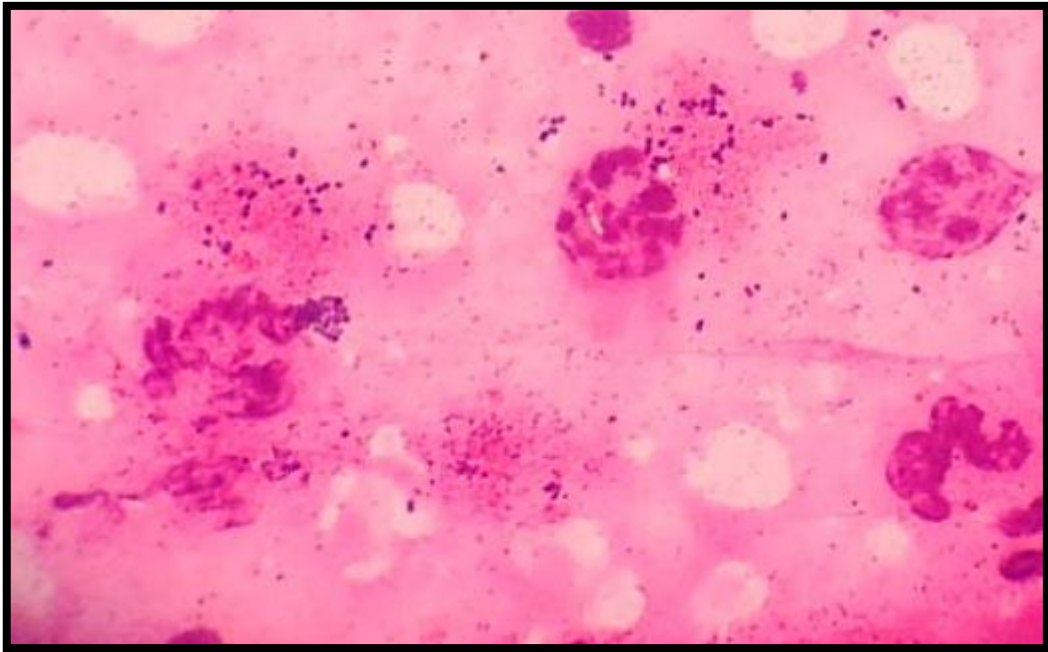


Imagen 24. SPE#14 grupo experimental, campo #13: presencia de cocos Gram +, cocos Gram -

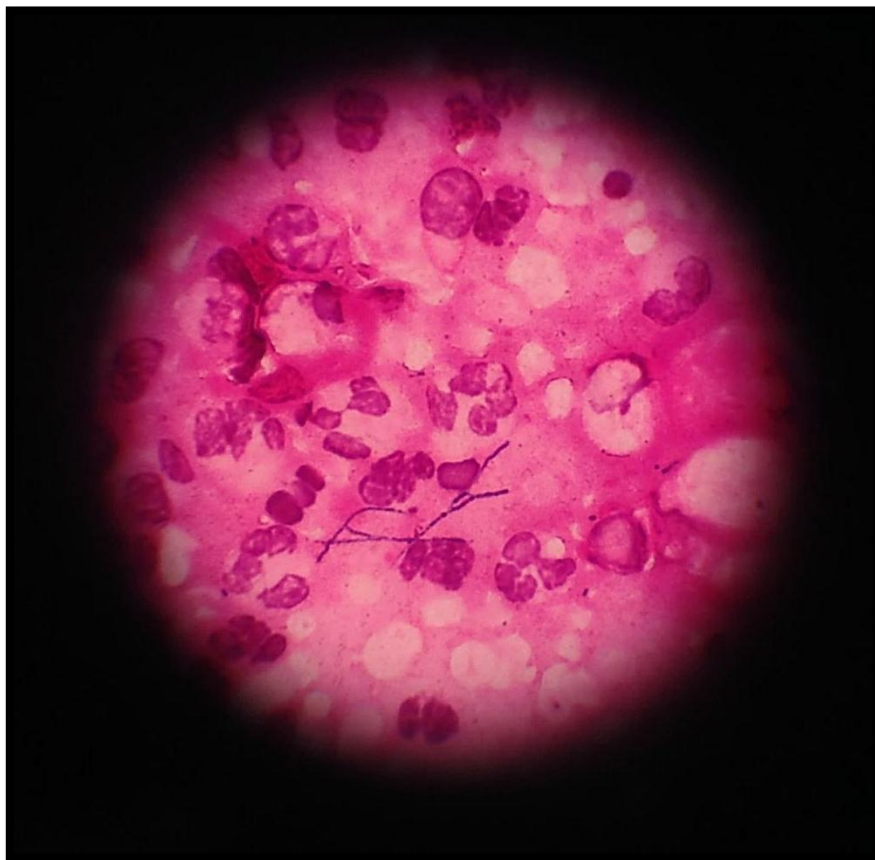


Imagen 25. SPE#19 grupo experimental, campo #43: bacilos Gram +



Imagen 26. Magnificación SPE#19 grupo experimental, campo #43: presencia de bacilos Gram +

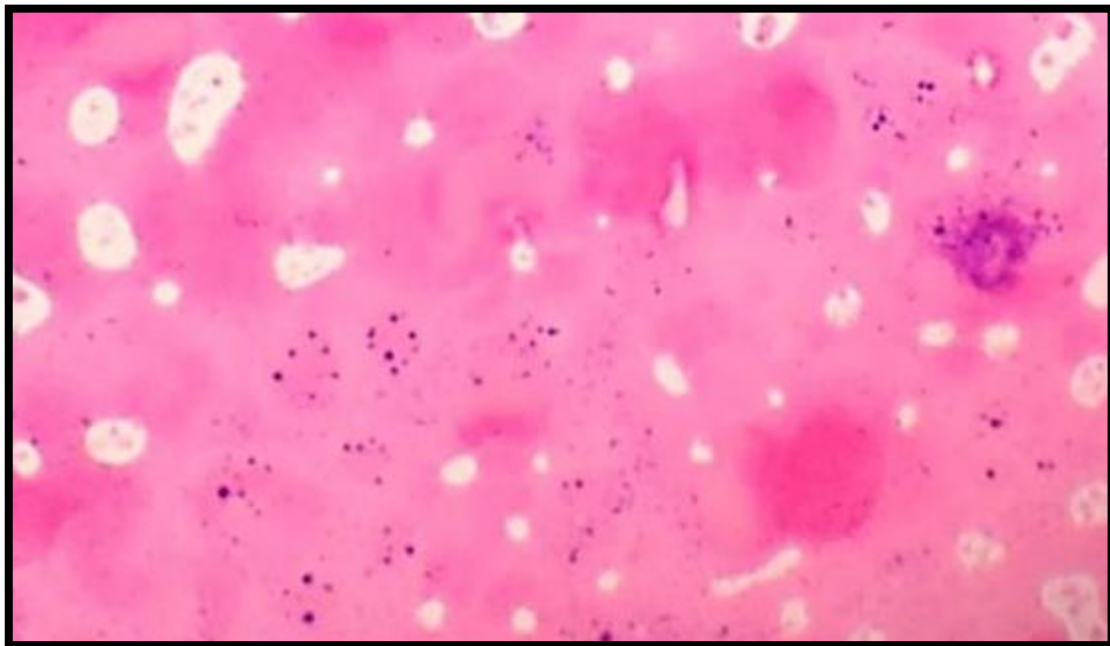


Imagen 27. SPE#18 grupo experimental, campo #23: presencia de cocos Gram +, cocos Gram +

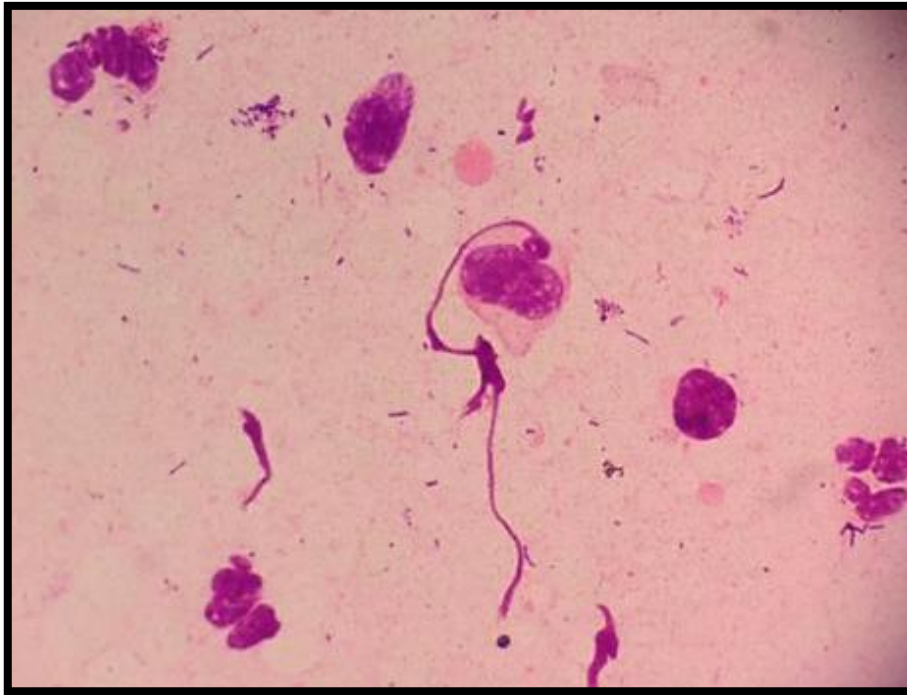


Imagen 28. SPE#2 grupo experimental, campo #22: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

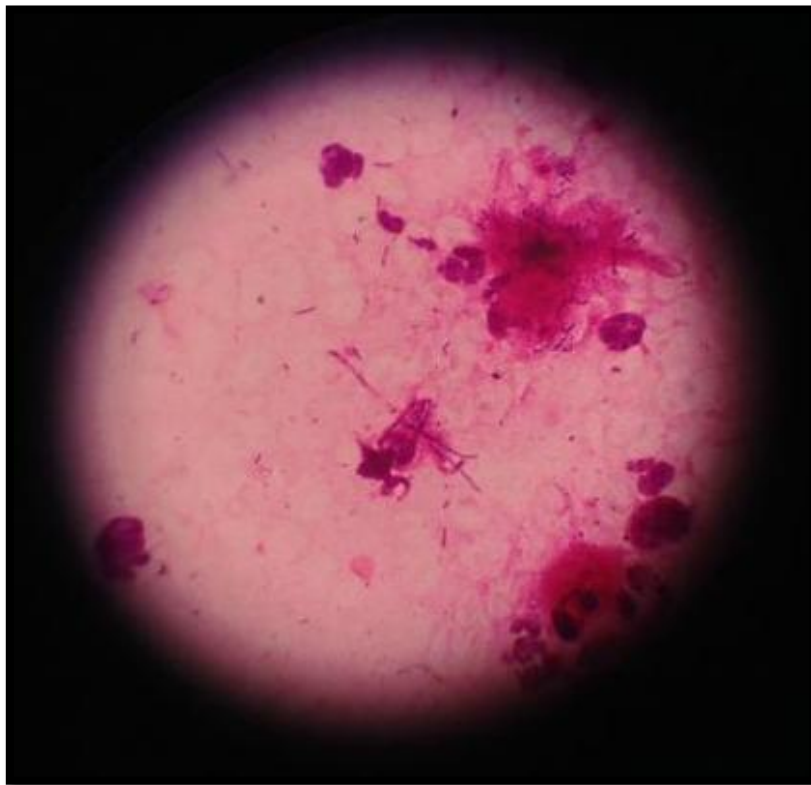


Imagen 29. SPE#10 grupo experimental, campo #36: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

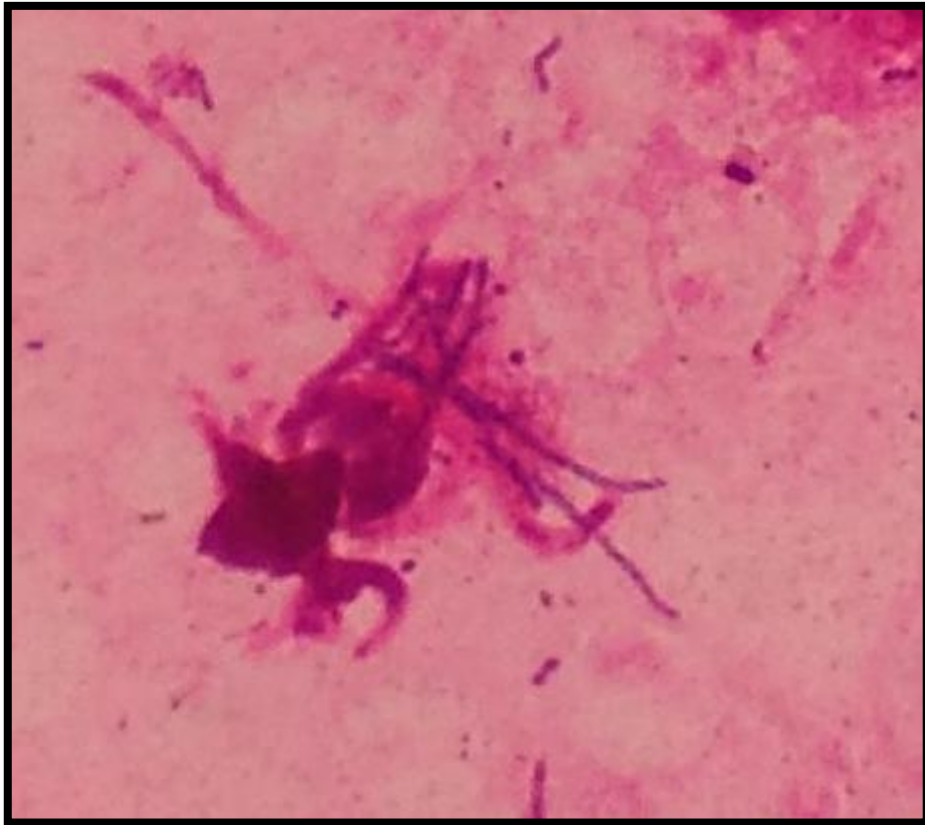


Imagen 30. Magnificación SPE#10 grupo experimental, campo #36: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

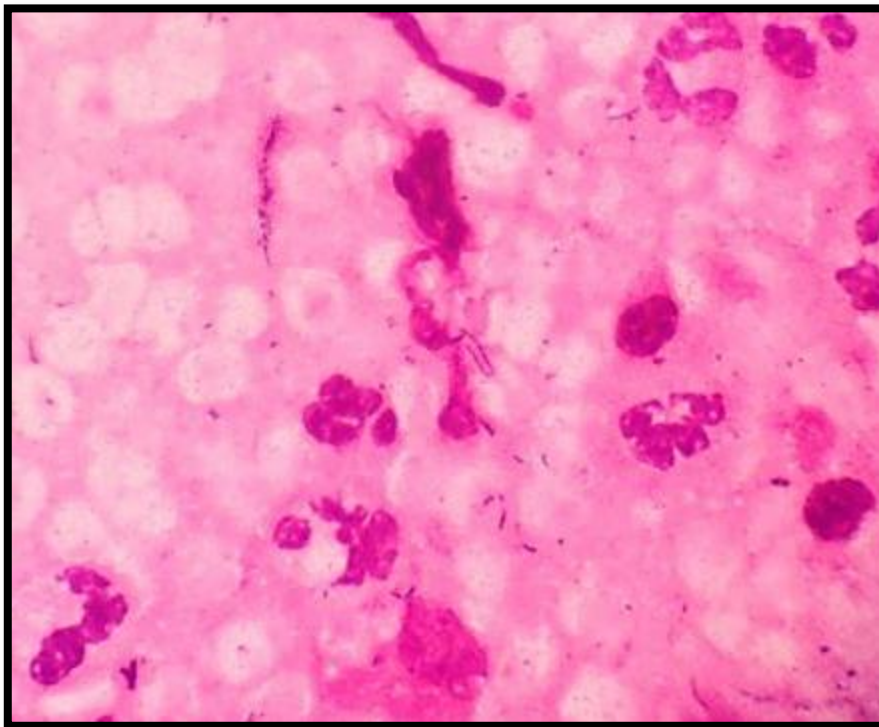


Imagen 31. SPE#11 grupo experimental, campo #18: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

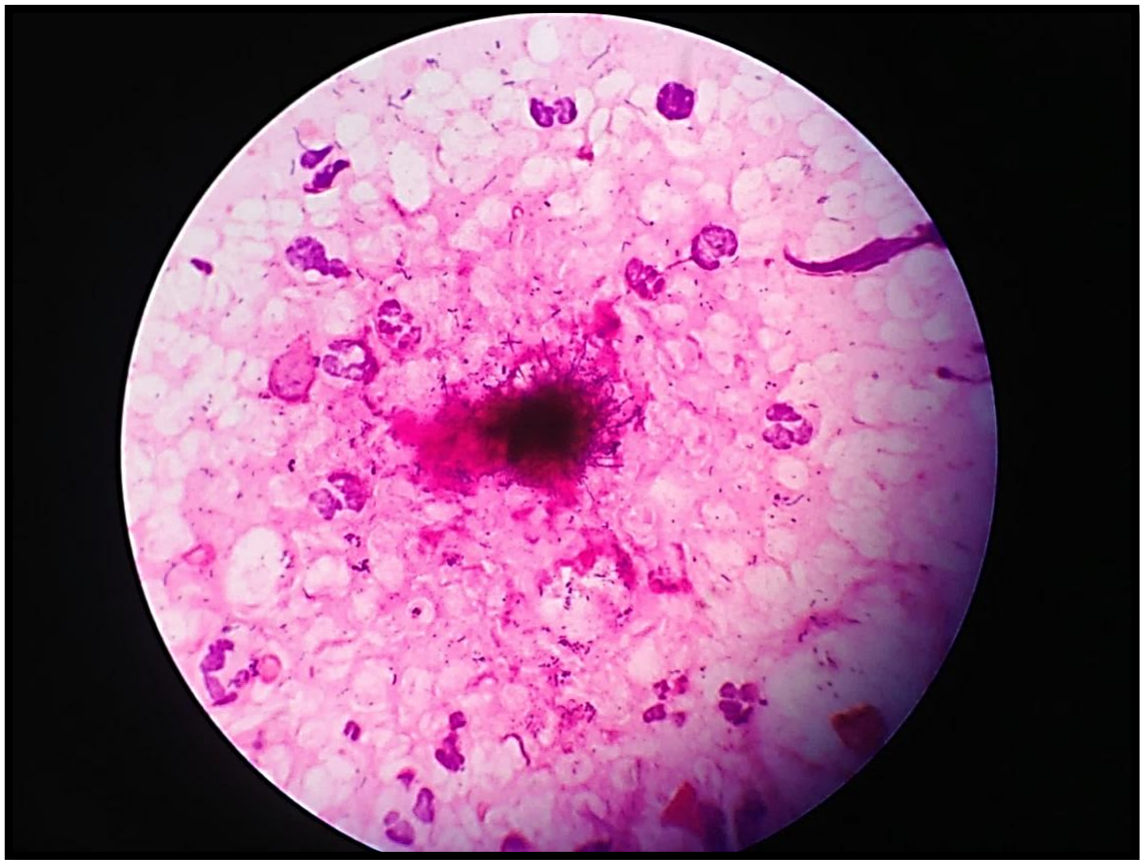


Imagen 32. SPE#11 grupo experimental, campo #18: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

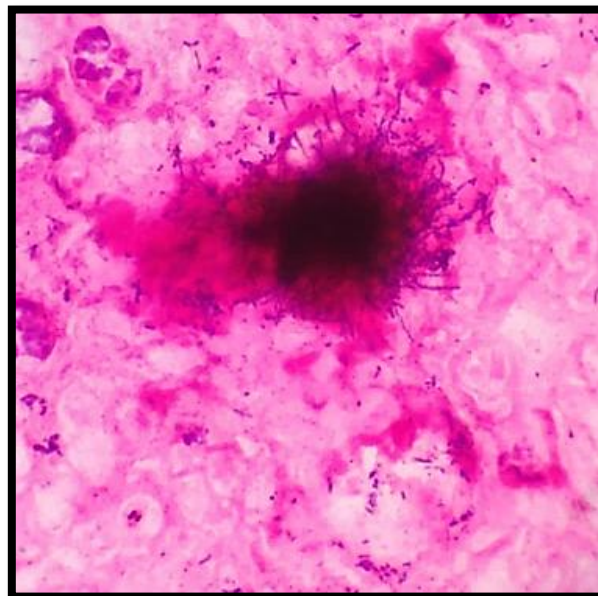


Imagen 33. Magnificación SPE#11 grupo experimental, campo #18: presencia de cocos Gram +, presencia de gránulo azufre rodeado por bacilos Gram +

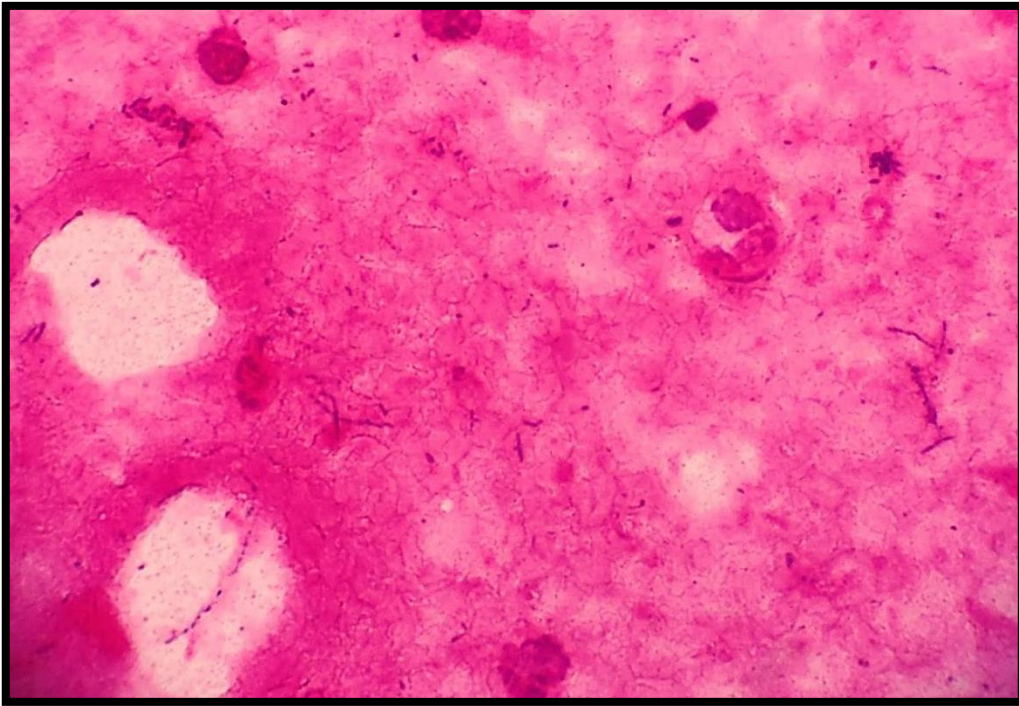


Imagen 34. SPE#3 grupo experimental, campo #4: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

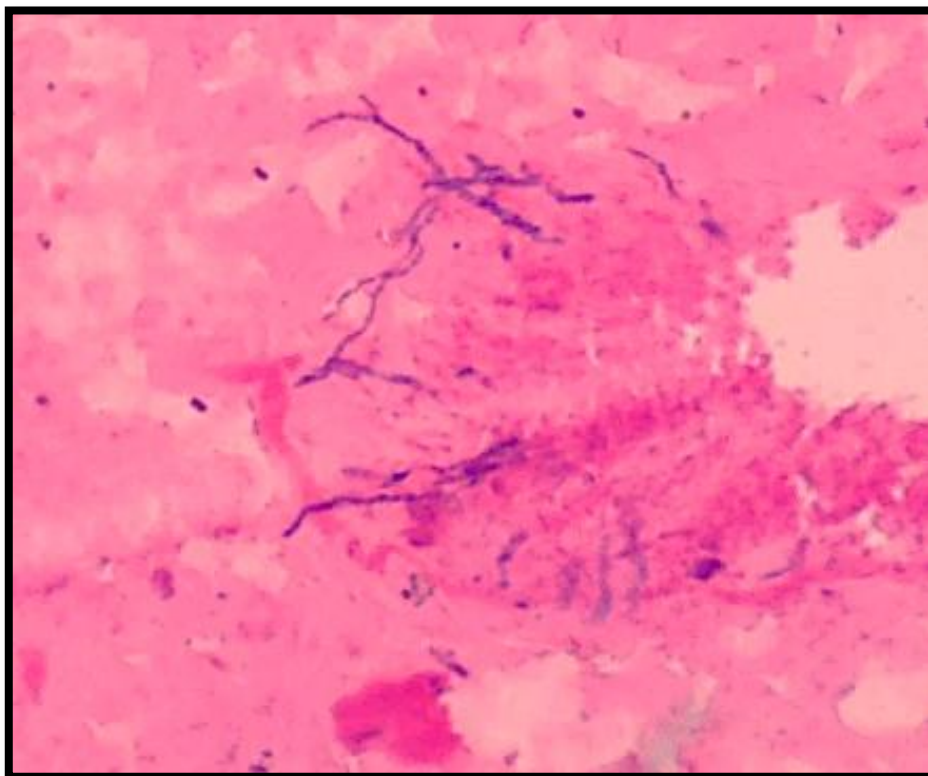


Imagen 35. SPE#11 grupo experimental, campo #3: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

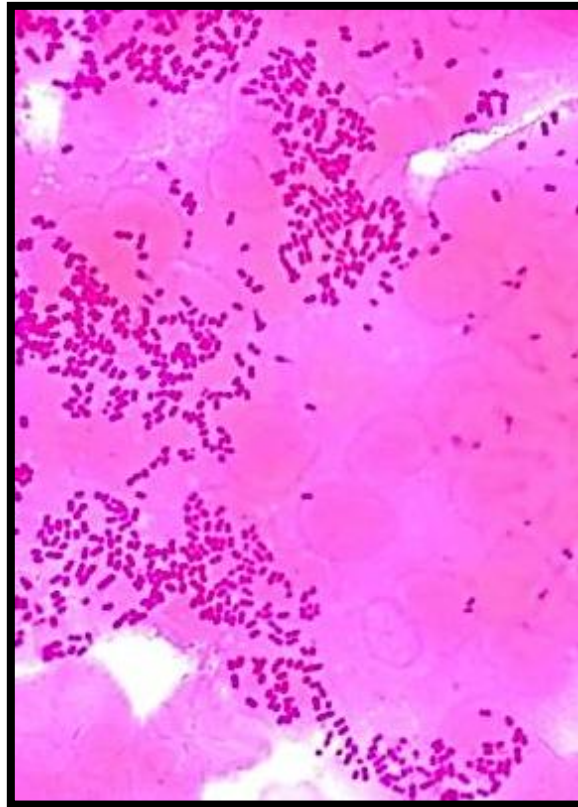


Imagen 36. SPE#8 grupo experimental, campo #2: presencia de cocos Gram +

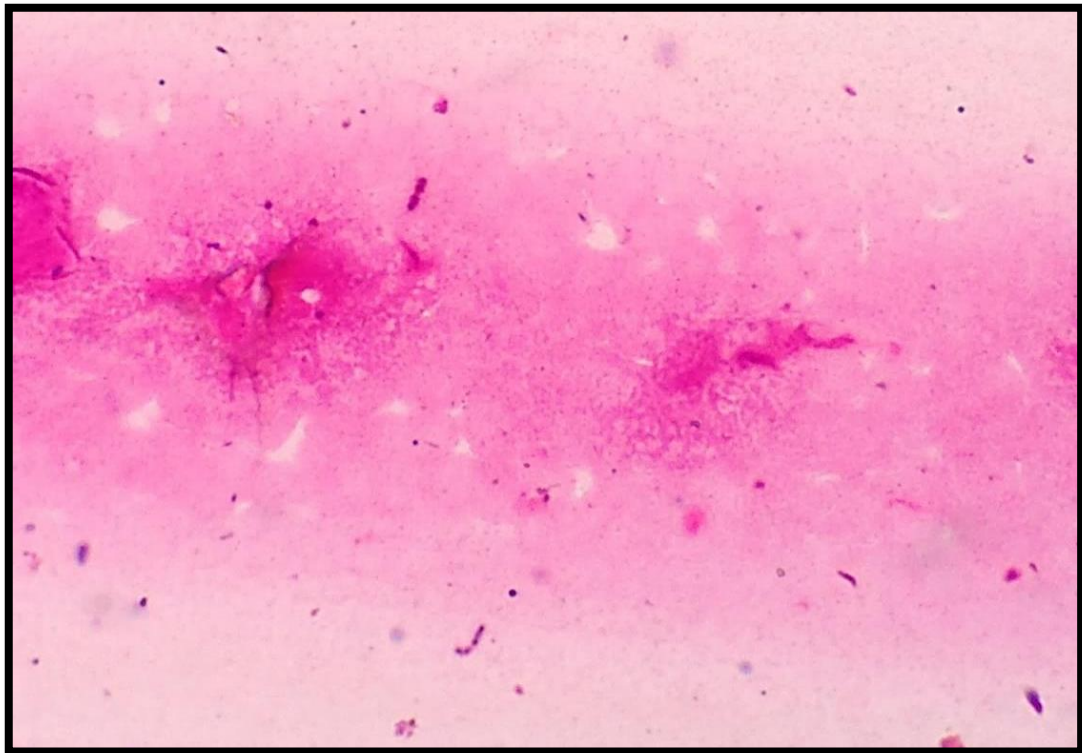


Imagen 38. SPE#4 grupo experimental, campo #19: presencia de cocos Gram +

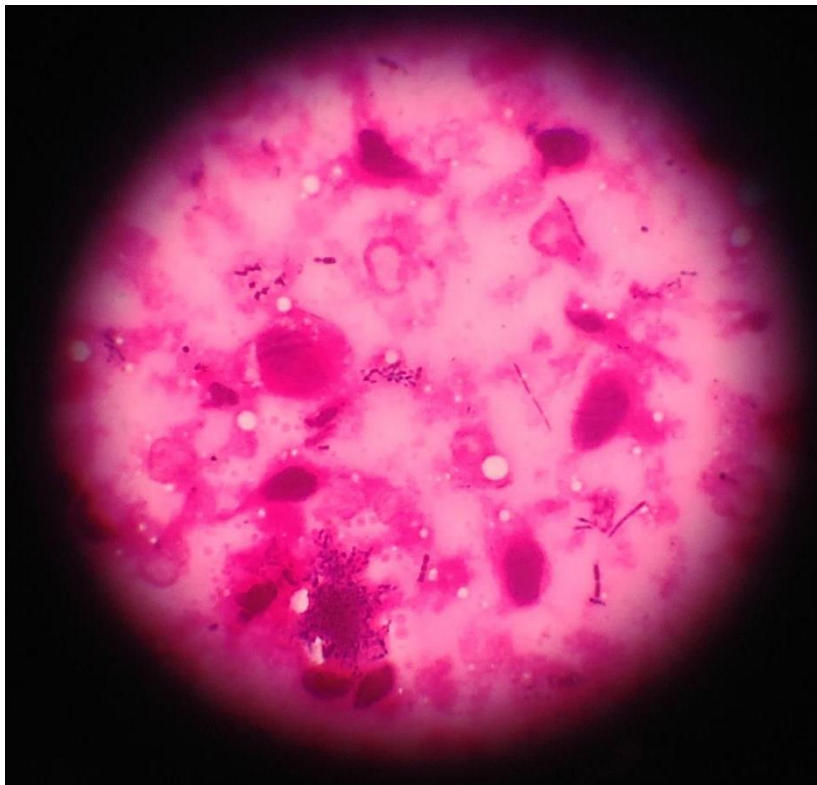


Imagen 39. SPE#19 grupo experimental, campo #15: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram + y células de defensa

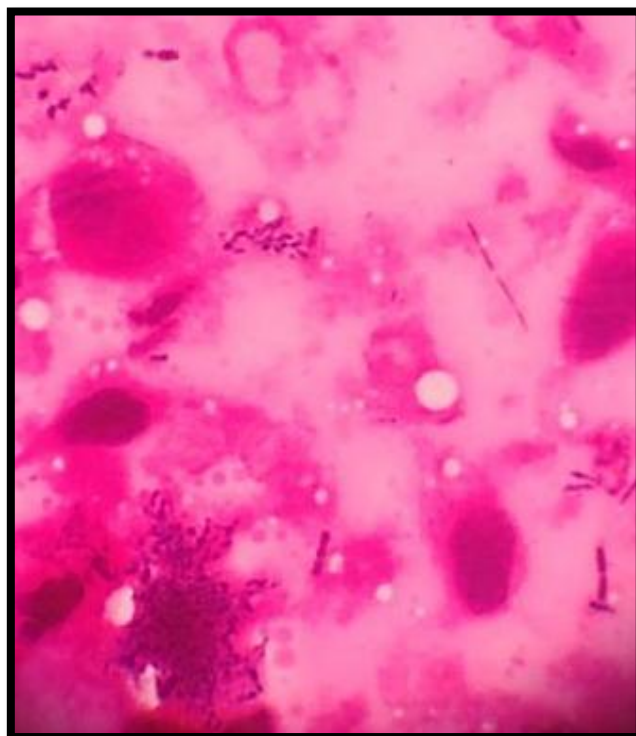


Imagen 40. Magnificación SPE#19 grupo experimental, campo #15: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

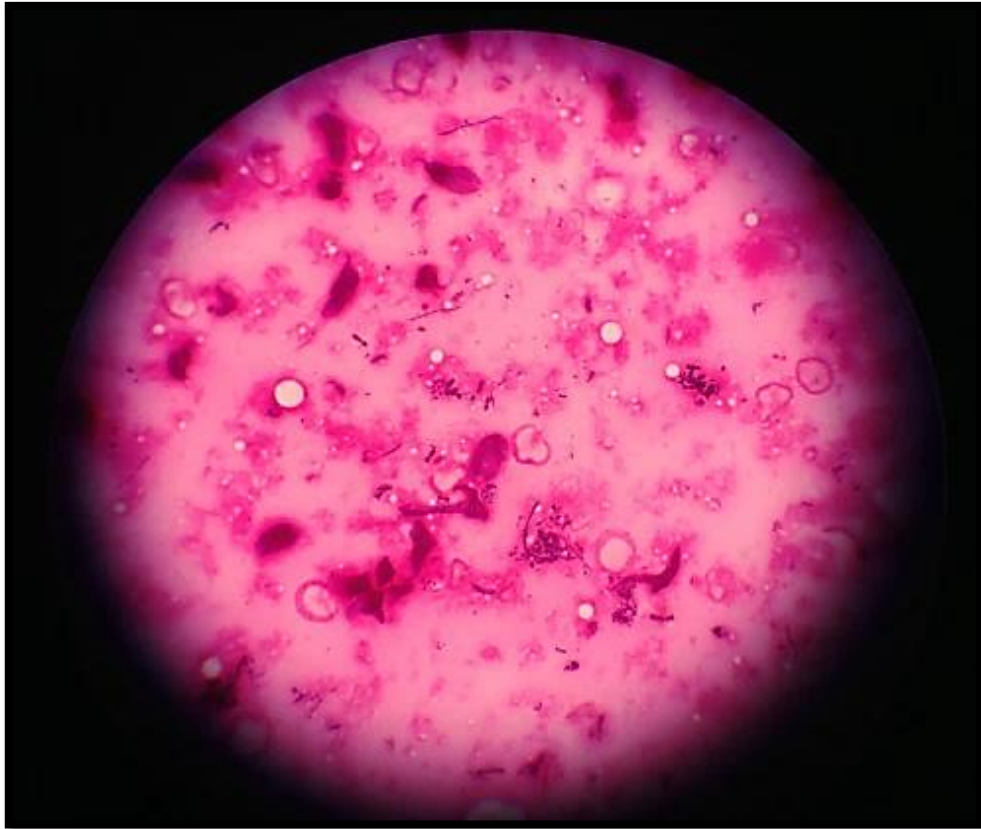


Imagen 41. SPE#19 grupo experimental, campo #11: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

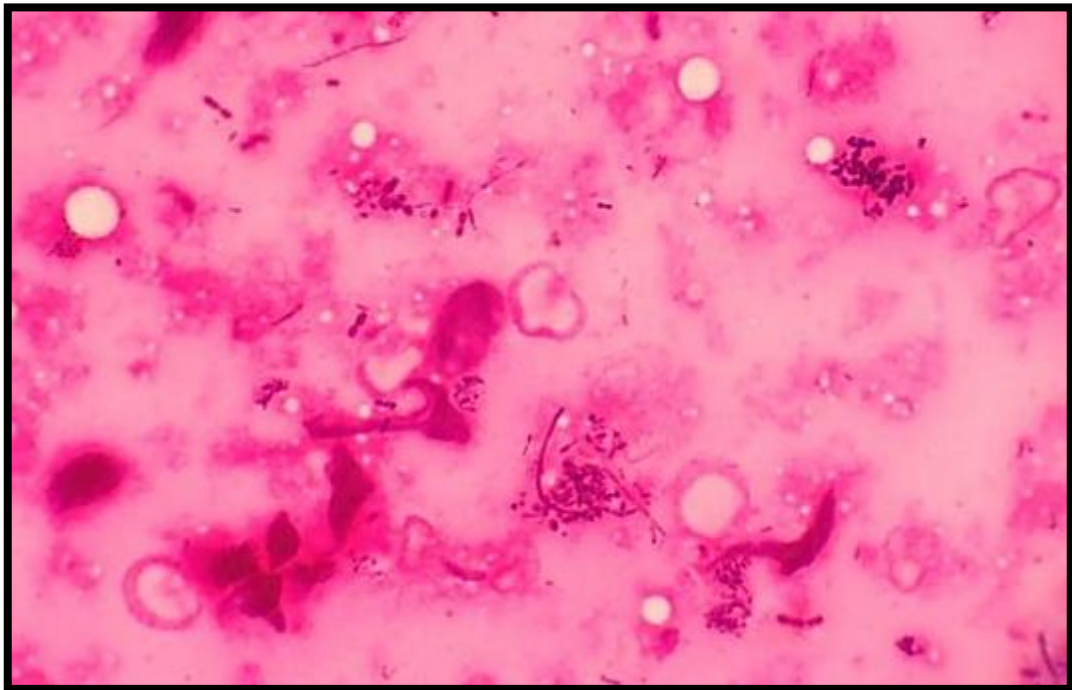


Imagen 42. Magnificación SPE#19 grupo experimental, campo #11: presencia de cocos Gram +, bacilos Gram +

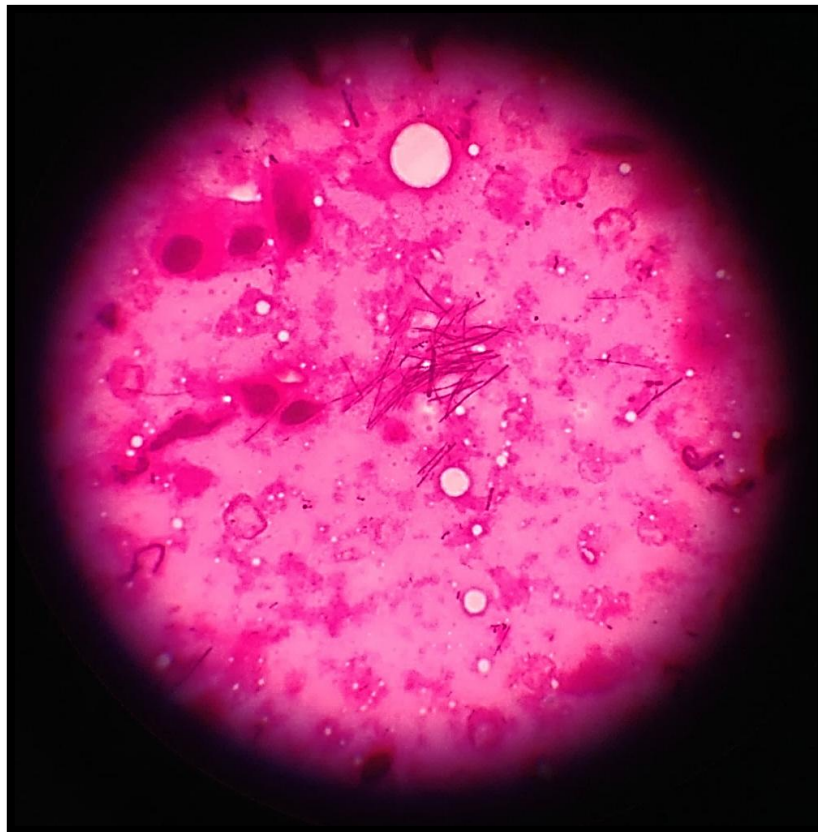


Imagen 43. SPE#11 grupo experimental, campo #7: bacilos Gram +

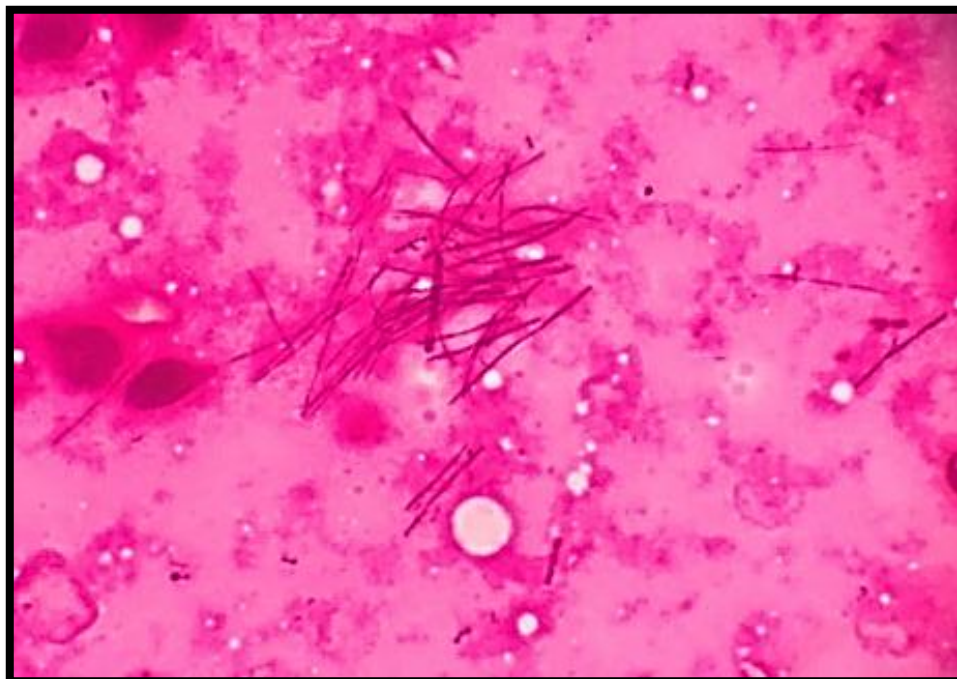


Imagen 44. Magnificación SPE#11 grupo experimental, campo #7: bacilos Gram +, cocos Gram +

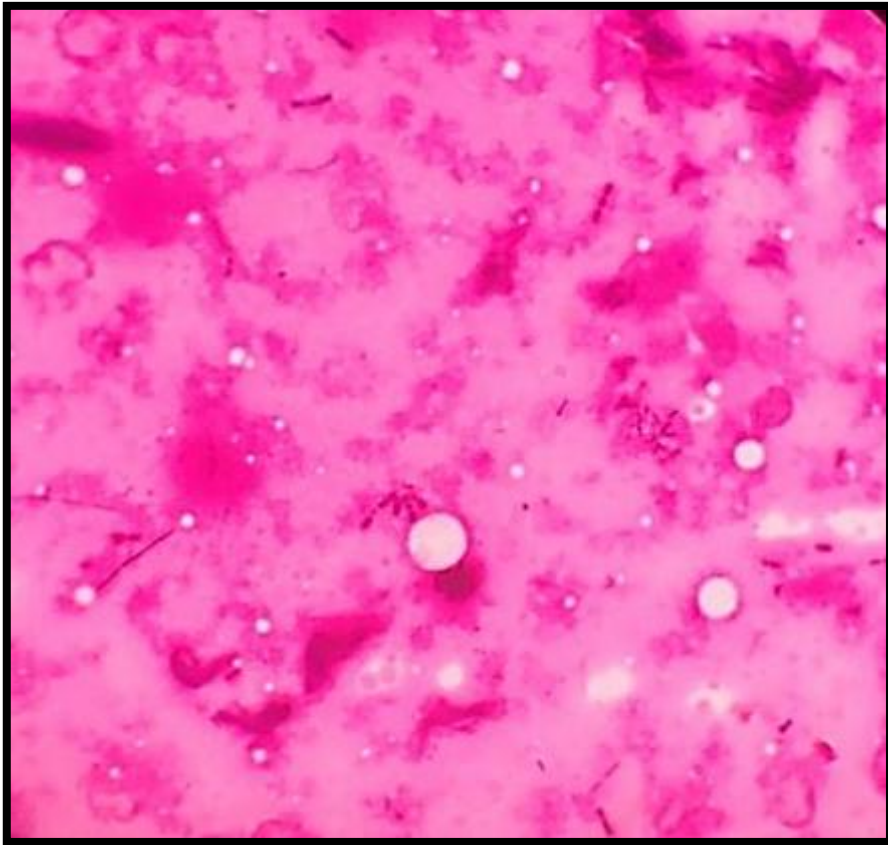


Imagen 45. Magnificación SPE#11 grupo experimental, campo #8: bacilos Gram +, cocos Gram +

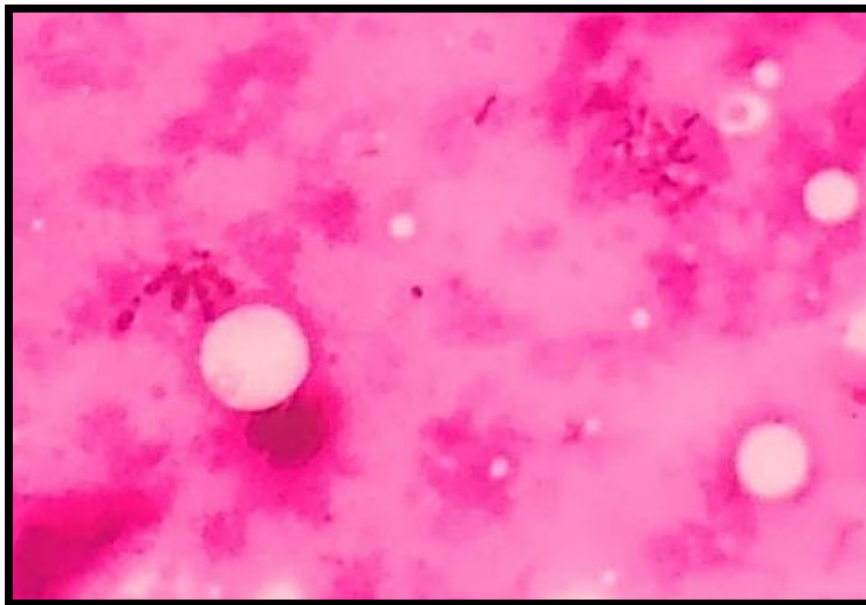


Imagen 46. Magnificación SPE#11 grupo experimental, campo #8: bacilos Gram +, levaduras

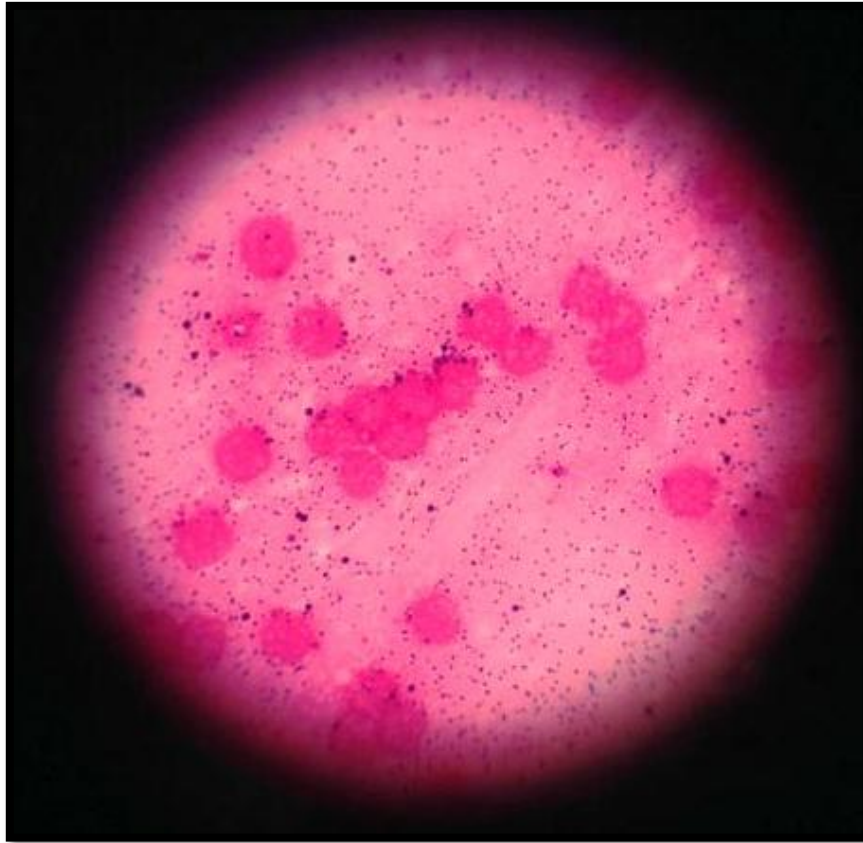


Imagen 47. SPE#20 grupo experimental, campo #6: cocos Gram +, presencia de artefacto posiblemente pus.

7.2. Tinción Gram: imágenes de campos con ausencia y presencia de microorganismos

del grupo control, se muestran los campos más relevantes de los 1750 campos observados, #50 por cada muestra.

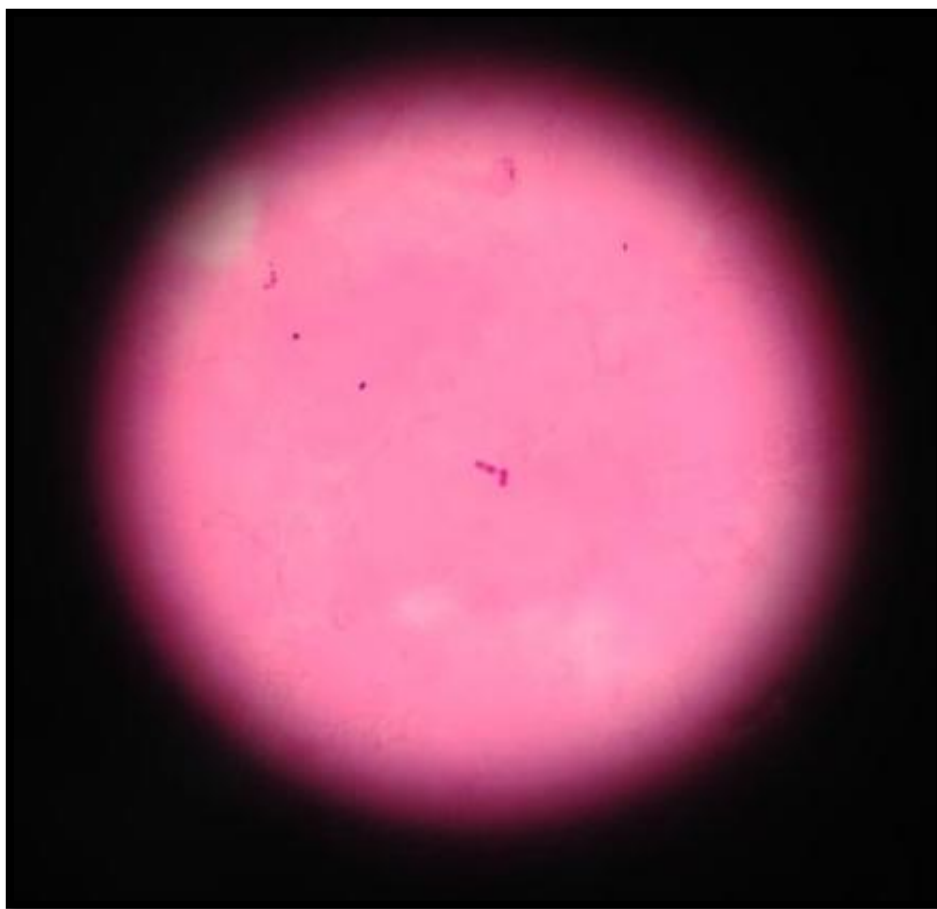


Imagen 48. SPE#31 grupo control, campo #22: presencia de cocos Gram – y cocos Gram +



Imagen 49. Magnificación SPE#31 grupo control, campo #22: presencia de cocos Gram –

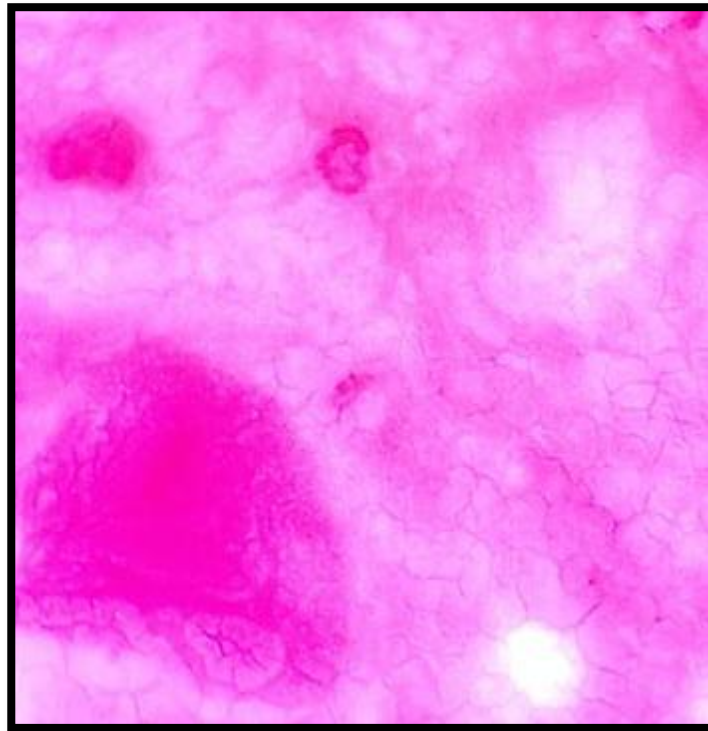


Imagen 50. SPE#6 grupo control, campo #14: ausencia de microorganismos en todos los campos

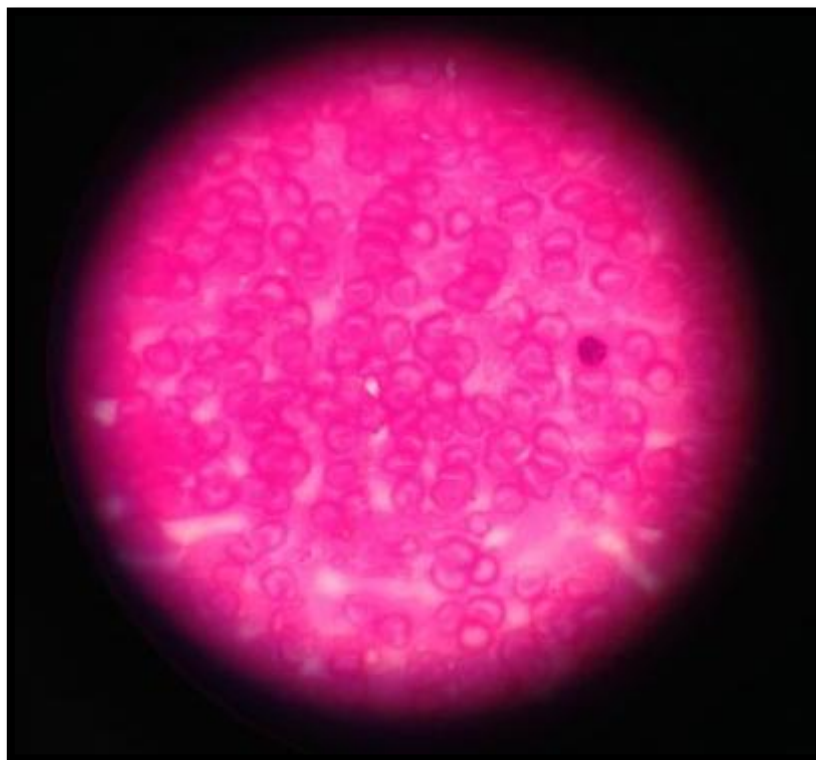


Imagen 51. SPE# 19 grupo control, campo #12: ausencia de microorganismos en todos los campos

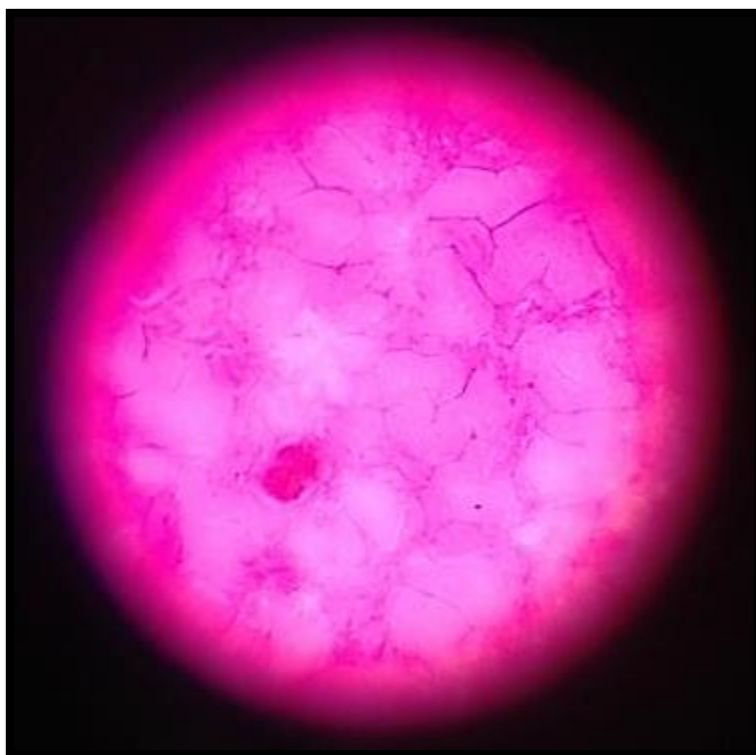


Imagen 52. SPE# 24 grupo control, campo #45: ausencia de microorganismos en todos los campos

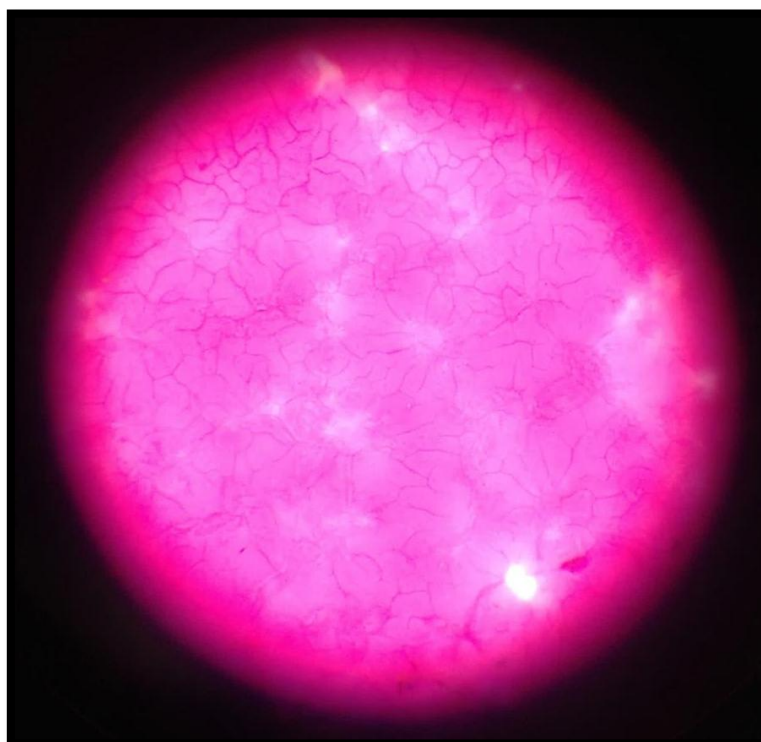


Imagen 53. SPE# 26 grupo control, campo #9: ausencia de microorganismos en todos los campos

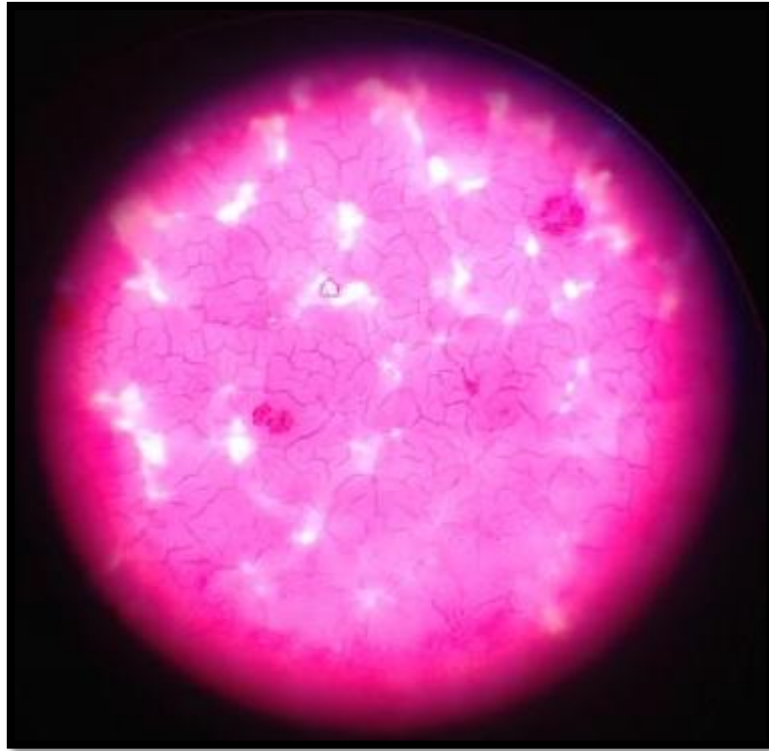


Imagen 54. SPE# 29 grupo control, campo #47: ausencia de microorganismos en todos los campos, presencia de células de defensa

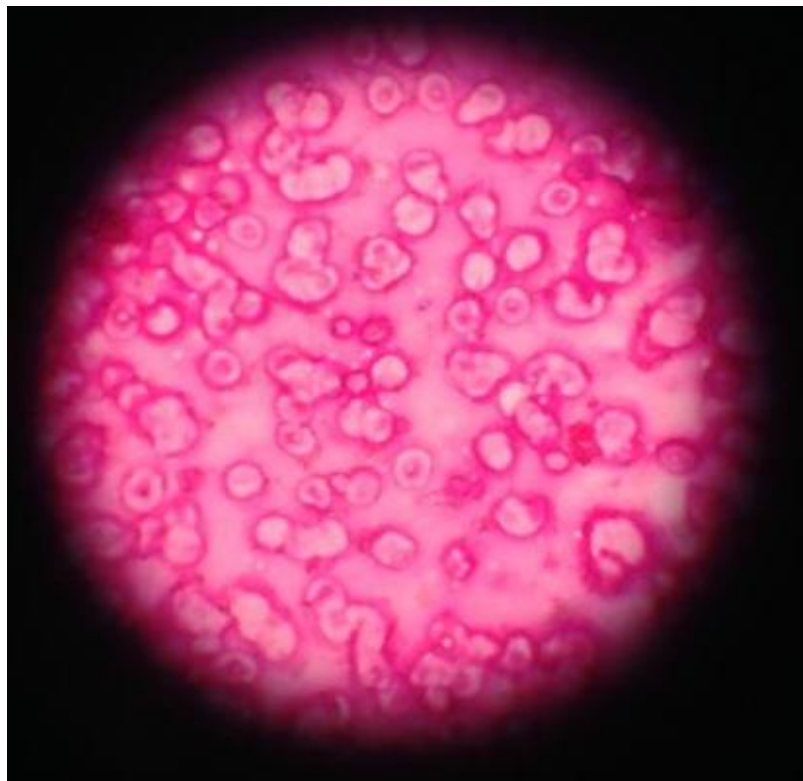


Imagen 53. SPE# 30 grupo control, campo #10: ausencia de microorganismos en todos los campos

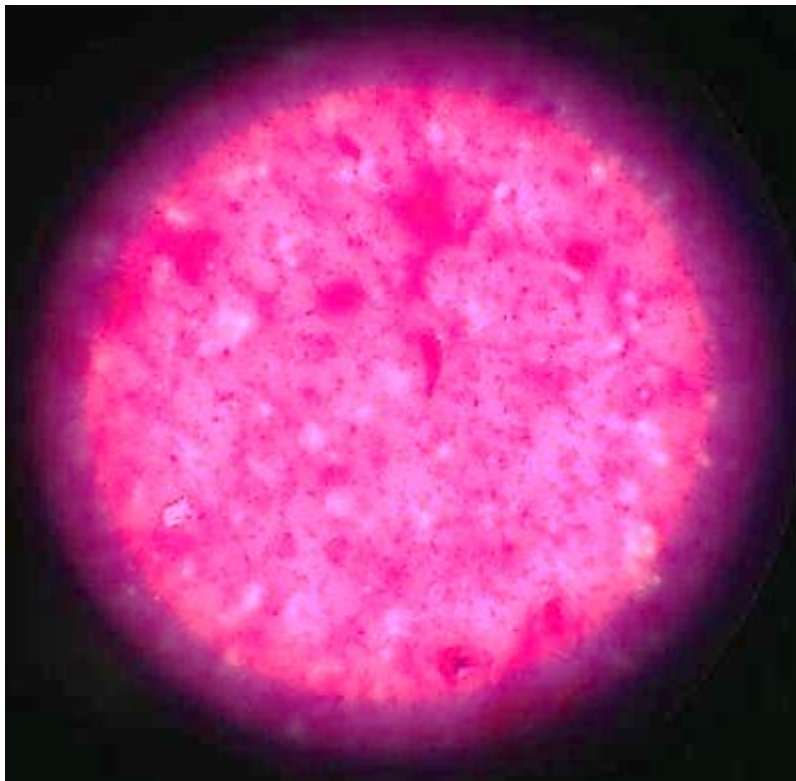


Imagen 54. SPE#34 grupo control, campo #39: ausencia de microorganismos en todos los campos observados

7.3. Tablas y gráficos de los resultados de la investigación

Tabla 16. Características del grupo Experimental #20 muestras (Tejido con lesión periapical)

*B-Actina: corresponde al PCR realizado para verificar la presencia de ADN

^aTiempo del antibiótico $\geq 24h$: igual o más de 24 horas

SPGE #	Pieza	Género	Edad	Antibiótico	Tipo antibiótico	tiempo antibiótico	B- Actina *
SPE1	4.4	M	64	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE2	2.2	F	28	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE3	1.2	F	28	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE4	1.3	F	21	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE5	1.2	F	21	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE6	1.5	F	28	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE7	2.5	F	30	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE8	2.5	M	26	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE9	1.2	M	43	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE10	1.1	M	42	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE11	2.4	F	58	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE12	2.4	F	65	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE13	2.1	F	58	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE14	4.4	F	60	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE15	2.5	F	60	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE16	3.1	F	61	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE17	3.2	F	61	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE18	3.3	F	61	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE19	1.5	F	62	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE20	2.5	F	29	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
Porcentaje		F=80% (16)					Positivo=100% (20)
		M= 20% (4)					

Tabla 17. Identificación de presencia de microorganismos del grupo Experimental en 1000 campos observados, #50 por cada muestra

SPGE #	Presencia Micro	Ausencia Micro	Cocos G -	Cocos G +	Bacilos G-	Bacilos G +	Levaduras
SPE1	35	15	5	33	0	2	0
SPE2	11	39	0	12	0	3	0
SPE3	25	25	25	22	0	3	0
SPE4	24	26	1	24	0	1	0
SPE5	26	24	3	26	0	0	0
SPE6	27	23	1	24	0	2	0
SPE7	0	50	0	0	0	0	0
SPE8	49	1	2	49	0	3	0
SPE9	37	13	0	33	0	4	0
SPE10	50	0	13	50	0	34	0
SPE11	29	21	3	23	2	5	1
SPE12	49	1	10	46	0	45	0
SPE13	0	50	0	0	0	0	0
SPE14	48	2	11	48	2	3	0
SPE15	0	50	0	0	0	0	0
SPE16	50	0	17	48	1	13	0
SPE17	0	50	0	0	0	0	0
SPE18	26	24	2	26	0	0	0
SPE19	35	15	8	24	0	11	0
SPE20	18	32	3	16	0	0	0
Total campos	539	461	104	504	5	129	1
Porcentaje	54%	46%	10%	50%	1%	13%	0,1%

Tabla18. Grupo Experimental: resultados y asociación de microorganismos presentes en tinción Gram y PCR

(+) : resultado positivo, (-) : resultado negativo, # M* : número de microorganismos identificados

SPE#	Dosis Antibiótico	Síntomas	T. Gram	Cocos G +	Cocos G -	Bacilos G -	Bacilos G +	Levaduras	# M*	16 s	C. albicans	E. faecalis
SPE1	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE2	profiláctica	si	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)		2 (+)	(-)	(+)
SPE3	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE4	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE5	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(+)	(-)
SPE6	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE7	≥ 24h	si	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		0 (-)	(-)	(-)
SPE8	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE9	≥ 24h	si	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)		2 (+)	(-)	(+)
SPE10	≥ 24h	si	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE11	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		5 (+)	(+)	(-)
SPE12	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		4 (+)	(+)	(+)
SPE13	profiláctica	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		0 (-)	(-)	(-)
SPE14	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		4 (+)	(-)	(-)
SPE15	≥ 24h	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		0 (-)	(-)	(-)
SPE16	≥ 24h	si	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		5 (+)	(+)	(-)
SPE17	≥ 24h	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		0 (-)	(-)	(-)
SPE18	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		2 (+)	(-)	(-)
SPE19	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		3 (+)	(-)	(-)
SPE20	≥ 24h	si	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)		2 (+)	(-)	(-)
Porcentaje	≥ 24h = 70%(14)	si = 30% (6)	(+)=80% (16)	(+)=80% (16)	(+)=70% (14)	(+)=15% (3)	(+)=65% (13)	(+)=5% (1)		(+)=80% (16)	(+)=20% (4)	(+)=15% (3)
	prof = 30% (6)	no= 70% (14)	(-)= 20% (4)	(-)=20% (4)	(-)=30% (6)	(-)=85% (17)	(-)=35% (7)	(-)=95% (19)		(-)=20% (4)	(-)=80% (16)	(-)=85%(17)

Tabla 19. Características del grupo control #35 muestras (Tejido sin lesión periapical)

*B-Actina: corresponde al PCR realizado para verificar la presencia de ADN

^a Tiempo del antibiótico $\geq 24h$: igual o más de 24 horas

SPGC #	Pieza	Género	Edad	Antibiótico	Tipo Antibiótico	tiempo Antibiótico	Beta Actina *
SPE1	1.8	F	21	si	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE2	2.8	F	21	si	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE3	2.8	F	18	no	ninguno	ninguno	positivo
SPE4	1.8	M	22	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE5	2.8	M	22	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE6	1.8	F	22	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE7	2.8	F	24	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE8	1.8	M	20	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE9	2.8	M	20	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE10	2.8	F	19	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE11	1.8	F	19	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE12	1.8	M	21	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE13	2.8	M	21	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE14	1.8	M	31	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE15	2.8	M	31	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE16	2.8	F	22	si	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE17	2.8	M	21	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE18	1.8	F	31	si	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE19	2.8	M	20	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE20	1.8	M	18	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE21	2.8	M	18	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE22	1.8	F	18	no	ninguno	ninguno	positivo
SPE23	1.8	F	18	si	amoxicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE24	2.8	F	18	si	amoxicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE25	1.8	M	19	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE26	2.8	M	19	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE27	2.8	M	18	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
SPE28	2.8	M	22	SI	sultamicilina	profiláctica	positivo

SPE29	1.4	F	18	NO	ninguno	ninguno	positivo
SPE30	2.4	F	18	NO	ninguno	ninguno	positivo
SPE31	1.4	F	20	no	ninguno	ninguno	positivo
SPE32	2.4	F	20	no	ninguno	ninguno	positivo
SPE33	2.8	M	20	si	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE34	1.8	F	22	SI	sultamicilina	$\geq 24h^a$	positivo
SPE35	2.8	F	23	si	sultamicilina	profiláctica	positivo
Porcentaje		F= 51.4% (18)					Positivo=100% (35)
		M= 48.6% (17)					

Tabla 20. Tinción Gram: Identificación de presencia de microorganismos del grupo control en 1750 campos observados, #50 por cada muestra

SPGC #	Presencia	Ausencia	Cocos G		Bacilos G -	Bacilos G +	Levaduras
	Micro	Micro	Cocos G -	+			
SPE1	0	50	0	0	0	0	0
SPE2	0	50	0	0	0	0	0
SPE3	0	50	0	0	0	0	0
SPE4	0	50	0	0	0	0	0
SPE5	0	50	0	0	0	0	0
SPE6	0	50	0	0	0	0	0
SPE7	0	50	0	0	0	0	0
SPE8	0	50	0	0	0	0	0
SPE9	0	50	0	0	0	0	0
SPE10	0	50	0	0	0	0	0
SPE11	0	50	0	0	0	0	0
SPE12	0	50	0	0	0	0	0
SPE13	0	50	0	0	0	0	0
SPE14	0	50	0	0	0	0	0
SPE15	0	50	0	0	0	0	0
SPE16	0	50	0	0	0	0	0

SPE17	0	50	0	0	0	0	0
SPE18	0	50	0	0	0	0	0
SPE19	0	50	0	0	0	0	0
SPE20	0	50	0	0	0	0	0
SPE21	0	50	0	0	0	0	0
SPE22	0	50	0	0	0	0	0
SPE23	0	50	0	0	0	0	0
SPE24	0	50	0	0	0	0	0
SPE25	0	50	0	0	0	0	0
SPE26	0	50	0	0	0	0	0
SPE27	0	50	0	0	0	0	0
SPE28	0	50	0	0	0	0	0
SPE29	0	50	0	0	0	0	0
SPE30	0	50	0	0	0	0	0
SPE31	4	46	1	3	0	0	0
SPE32	0	50	0	0	0	0	0
SPE33	0	50	0	0	0	0	0
SPE34	0	50	0	0	0	0	0
SPE35	0	50	0	0	0	0	0
Total Campos	4	1746	1	3	0	0	0
Porcentaje	0,23%	99,8%	0,1%	0,3%	0%	0%	0%

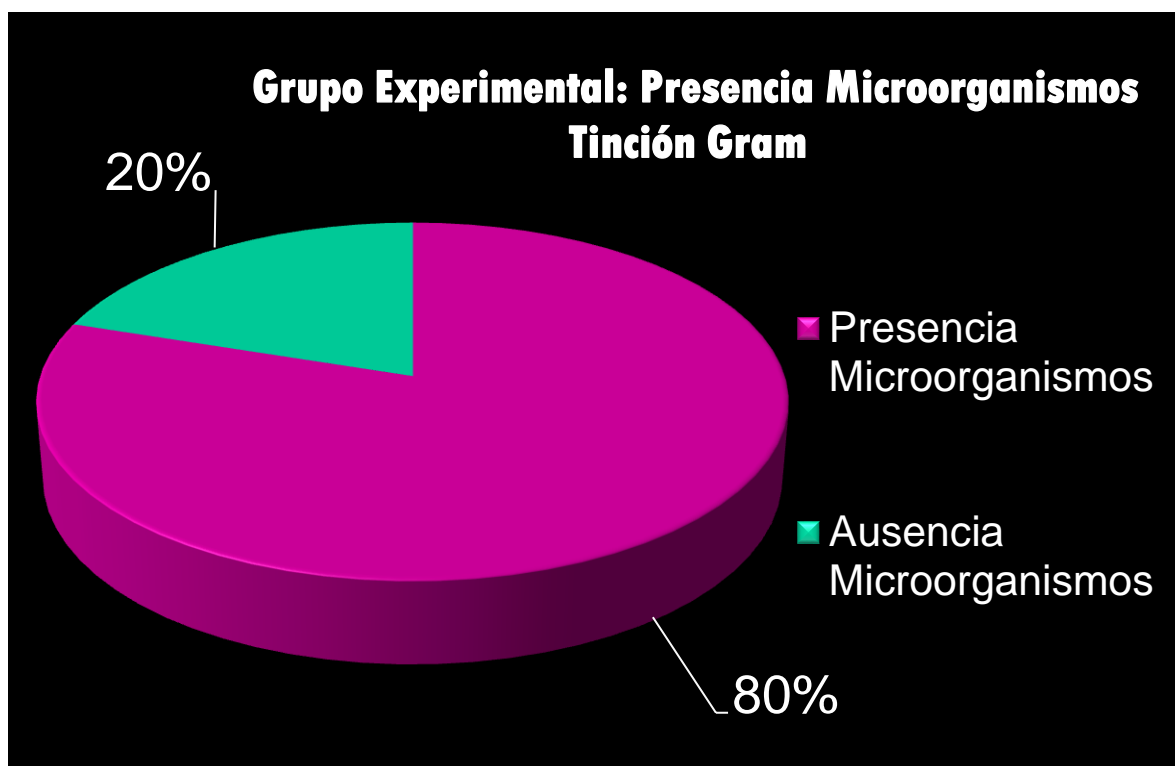


Gráfico 13. Grupo Experimental: % Presencia Microorganismos Tinción Gram

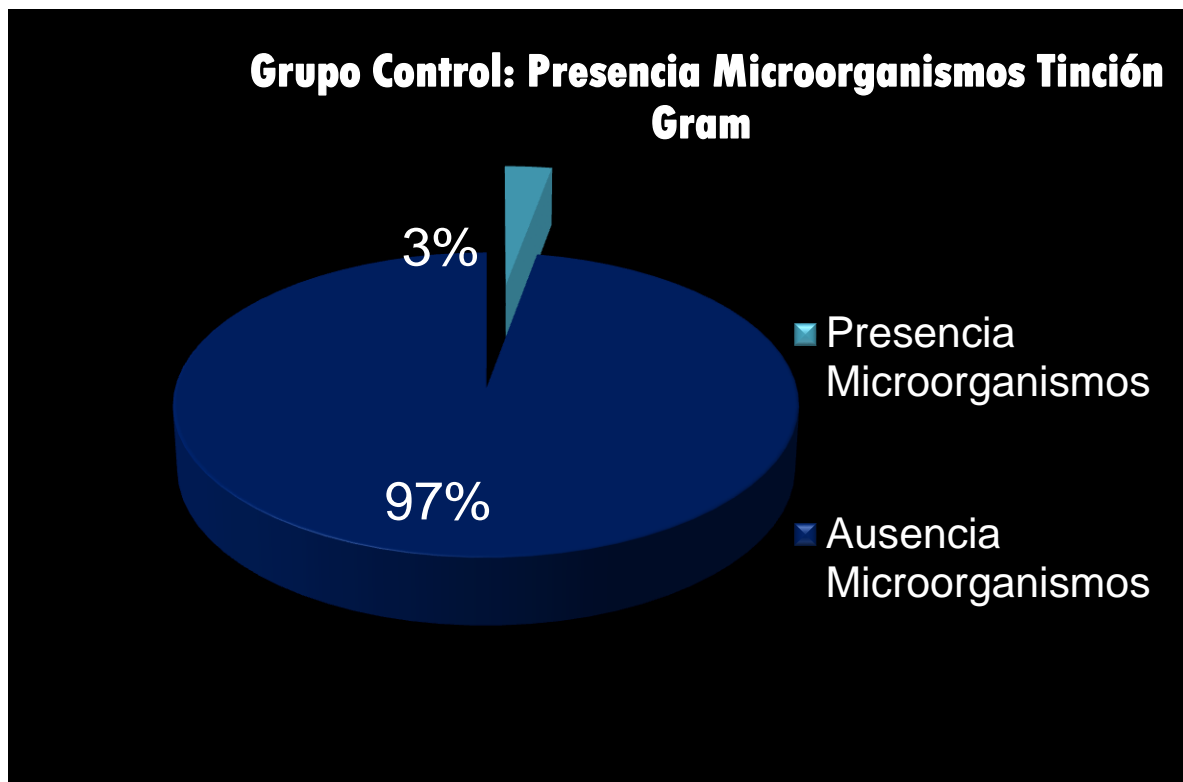


Gráfico 14. Grupo Control: % Presencia Microorganismos Tinción Gram

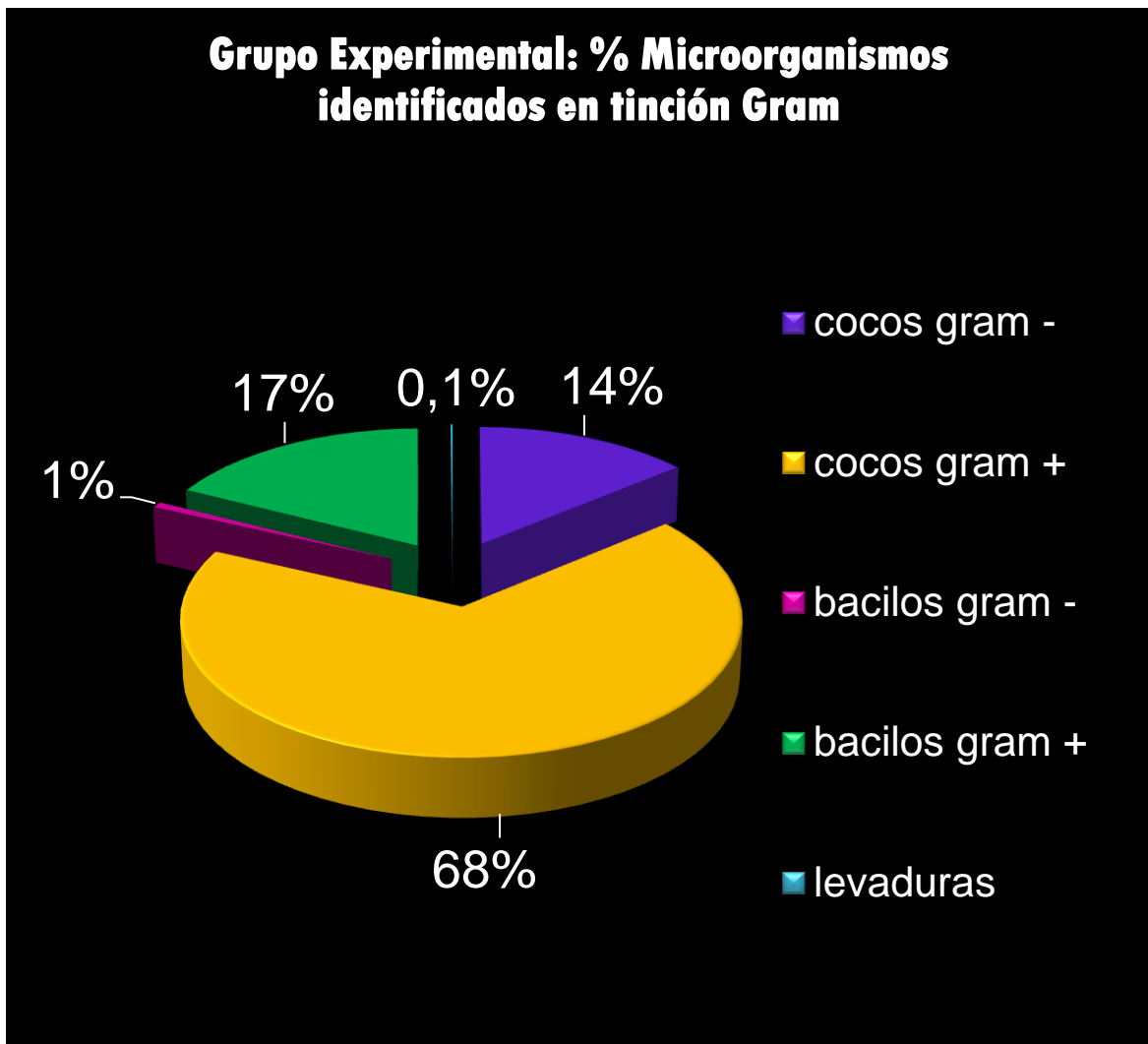


Gráfico 15. Grupo Experimental: % Microorganismos identificados en tinción Gram

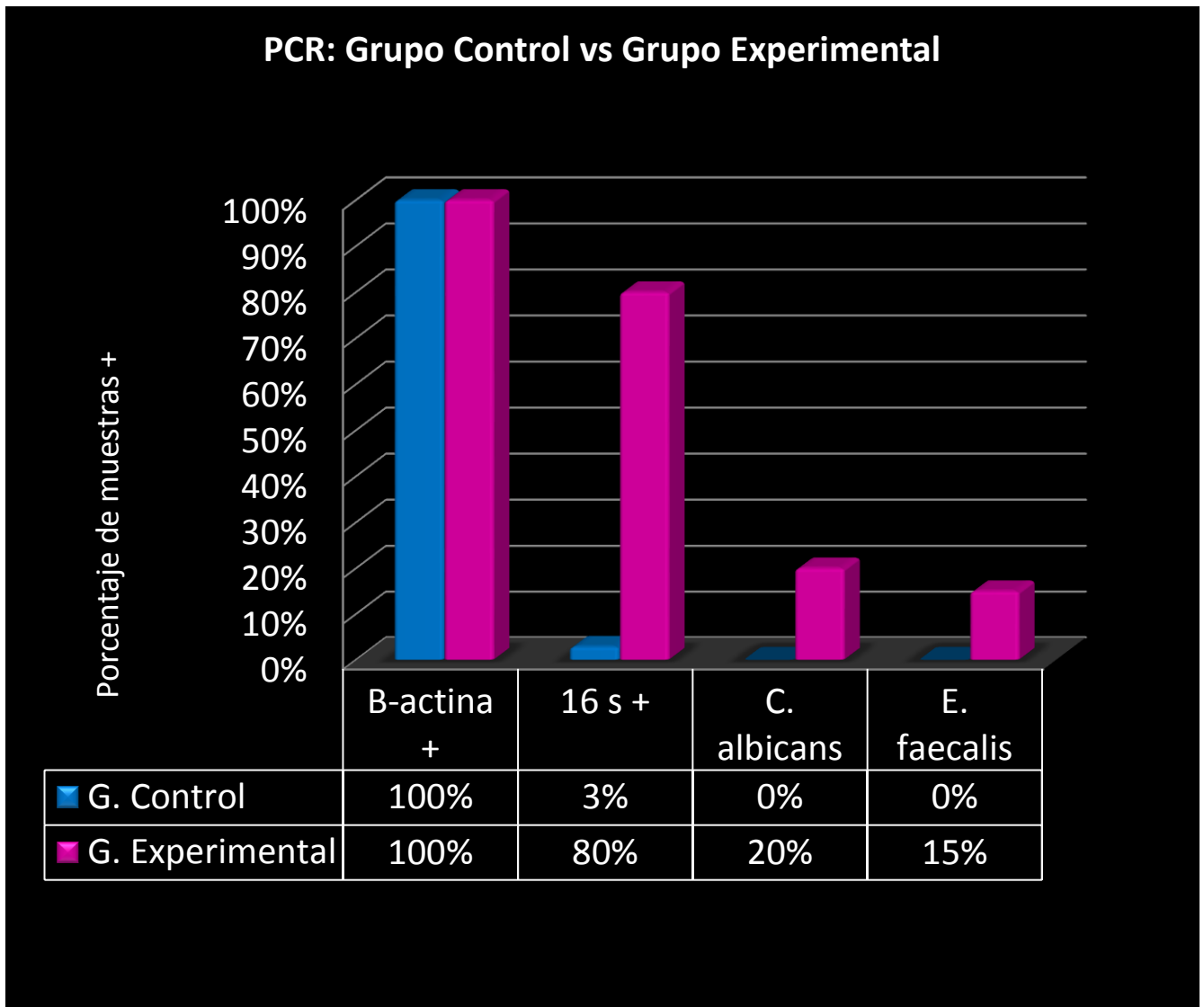


Gráfico 16. PCR Grupo Control vs Grupo Experimental

Tabla 22. Análisis OR: asociación de presencia de bacteriana (16 s positivo) con diferentes parámetros clínicos

Asociación con:	OR (Intervalo de confianza IC95%)	Prueba exacta de Fisher	Estadísticamente significativo P < 0.05
Periodontitis periapical refractaria	136 IC= 14.6-317	0.0000000025	0.0000000025 < 0.05 +
Pacientes sintomáticos	2 IC=0.12-22,95	0.51	0.51 >0.05 *
Pacientes asintomáticos	0.5 IC=0.043-5.73	0.51	0.51 >0.05 *
Profilaxis antibiótica	1.36 IC= 0.11-16.57	0.65	0.65 >0.05 *
Dosis antibiótica ≥ 24h	0.733 IC= 0.06-8.9	0.65	0.65 >0.05 *
Tejidos sanos	0.0074 IC= 0.0008-0.0712	0.0000000025	0.0000000025 < 0.05 +

+ Significativo estadísticamente

***No significativo estadísticamente**

Tabla 23. Análisis OR: asociación de los microorganismos indentificados como factor causal de la periodontitis periapical refractaria

Microorganismo	OR (Intervalo de confianza IC95%)	Prueba exacta de Fisher	Estadísticamente significativo P < 0.05
<i>C. albicans</i>	19.36	0.014	0.014 < 0.05 +
<i>E. faecalis</i>	14.22	0.043	0.043 < 0.05 +
Cocos Gram +	136 IC=14-317	0.0000000025	0.0000000025 < 0.05 +
Cocos Gram -	79 IC=8,7-720	0.000000115	0.000000115 < 0.05 +
Bacilos Gram +	127.8	0.000000053	0.000000053 < 0.05 +
Bacilos Gram -	14.22	0.043	0.0435 < 0.05 +

+ Significativo estadísticamente

Tabla 24. Análisis OR: asociación de microorganismos identificados con presencia de síntomas

Microorganismo	OR (Intervalo de confianza IC95%)	Prueba exacta de Fisher	Estadísticamente significativo P < 0.05
<i>C. albicans</i>	0.733 IC=0.06-8.9	0.65	0.65 >0.05 *
<i>E. faecalis</i>	6.5 IC=0.46-91.9	0.201	0.201 >0.05 *
Cocos Gram +	1.36 IC= 0.11-16.57	0.657	0.657 >0.05 *
Cocos Gram -	0.27 IC=0.035-211	0.225	0.22 >0.05 *
Bacilos Gram +	1.11 IC= 0.14-8.36	0.664	0.66 >0.05 *
Bacilos Gram -	1.2 IC= 0.082-16.4	0.68	0.68 >0.05 *

***No significativo estadísticamente**

Tabla 25. Media microorganismos identificados en Grupo experimental y control

Media microorganismos identificados: muestras del grupo experimental	Media microorganismos identificados: muestras del grupo control	Prueba T P<0.05
2.5	0.057	0.0000001<0.05 (significativo)

Tabla 26. Media microorganismos identificados en pacientes sintomáticos y asintomáticos

Media microorganismos identificados: muestras de pacientes sintomáticos	Media microorganismos identificados: muestras de pacientes asintomáticos	Prueba T P<0.05
2.47	2.53	0.7769 (no significativo)

Tabla 27. Análisis de sensibilidad y especificidad de PCR vs tinción Gram

Análisis sensibilidad vs especificidad			
	PCR 16S (Prueba estándar de oro)		
Tinción Gram presencia bacteriana	Enfermos	Sanos	Totales + y -
Positivos	16	1	17
Negativos	4	34	38
Total	20	35	
Sensibilidad	80%		
Especificidad	97%		
	PCR <i>Candida albicans</i> (Prueba estándar de Oro)		
Tinción Gram presencia levaduras	Enfermos	Sanos	Totales + y -
Positivos	1	0	1
Negativos	19	35	54
Total	20	35	
Sensibilidad:	5%		
Especificidad:	100%		

8. DISCUSIONES

Cabe recalcar que a pesar de la controversia existente sobre la presencia de microbiota en los tejidos perirradiculares reportada por autores como Nair, Zuolo, Waltimo, Cohen, ente otros, este estudio corrobora la presencia positiva de microorganismos en el 80% es decir la mayoría de las muestras de tejidos periapicales con lesión de pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos con dosis antibiótica previa. De la misma manera evidencia la presencia de *C. albicans* en el 20% de las muestras de tejidos enfermos y en el 15% la presencia de *E. faecalis* de los mismos tejidos. La presencia de microorganismos en el 80% de muestras de este estudio corrobora la observación de estudios anteriores sobre la presencia de microorganismos similares en los mismos tipos de lesión. Por ejemplo Stewart y Corteson, 2001 aplicando tecnologías moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reportan microorganismos en 35 de 36 muestras (97%) tomadas de tejido con lesión. Por su lado, Subramanian y Mickel, 2009 encuentran que 27 de 33 muestras de tejido enfermo (81%) revelan presencia de microbiota, además Sunde et al, 2000 reporta que 34 de las 34 muestras (100%) de lesiones asintomáticas presentan microorganismos y Saber et al, 2012 por medio de la técnica de pirosecuenciamiento 454 lo reporta en 7 de las 15 muestras (54%) de lesiones sintomáticas y asintomáticas. Cabe resaltar que todos los estudios mencionados no contaron con un grupo control de tejidos sanos por lo cual solo revelaron la presencia de microbiota pero no la pudieron establecer como factor causal de la enfermedad. En general los otros estudios establecen la frecuencia de microorganismos encontrados pero en los mismos se detalla que no se ha establecido el rol de la microbiota encontrada con la etiopatogenia de la enfermedad. Al ser uno de los objetivos de este estudio identificar la presencia de bacterias y levaduras en los tejidos enfermos para asociarla como un factor

causal de la lesión, se optó por agregar el grupo control de tejidos sanos a fin de dar el parámetro de comparación para realizar el análisis OR y establecer el factor de riesgo de la enfermedad. El análisis de los resultados de este estudio demuestra que al comparar la presencia de microorganismos entre las muestras de tejido sano y tejido enfermo se pudo establecer que la microbiota en los tejidos perirradiculares lesionados es un factor causal de la enfermedad. Esto se revela en el análisis OR que asocia la presencia bacteriana y de *Candida albicans* en los tejidos enfermos con el incremento de riesgo para la persistencia de la lesión. Se estableció consiguientemente que la presencia bacteriana aumenta en 136 veces la probabilidad de desarrollar la periodontitis periapical refractaria. Además, la presencia bacteriana específica aumentó la probabilidad de desarrollar la enfermedad de la siguiente manera: *E. faecalis* en 14.22 veces, cocos Gram + en 136 veces, cocos Gram – en 79 veces, bacilos Gram + en 127.8 veces, bacilos Gram – en 14.22 veces y *C. albicans* que es una levadura en 19.36 veces. Como se detalló anteriormente en los resultados todas estas asociaciones fueron estadísticamente significativas ya que $P < 0.05$. Con lo mencionado anteriormente se puede establecer que la presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares es un factor de riesgo para la persistencia de la periodontitis periapical, esto involucra a los microorganismos encontrados en la fisiopatología de la enfermedad. En estudios similares no se comparó la presencia de microbiota entre tejidos sanos y enfermos, es decir no se tomó en cuenta un grupo control por lo que no se estableció la relación causal antes mencionada.

Al comparar las muestras de tejido sano con las de tejido enfermo también se consiguió verificar que el protocolo seguido a fin de evitar la contaminación de la muestra con la microbiota del medio oral fue correcta ya que 97% de las muestras de tejido sano no mostraron presencia de microorganismos tanto en la tinción Gram como en la identificación molecular con PCR. El 3% o 1 muestra de las 35 del grupo control reveló la presencia de microorganismos, esto de acuerdo a los otros resultados de la investigación se puede deducir que fue por un error en el momento de tomar la muestra en la que pudo contaminarse al tener contacto con saliva, dientes, lengua o mucosa del paciente.

Se hizo también un análisis sobre la toma de antibiótico previo a la cirugía, uno de los objetivos del estudio fue determinar si la dosis de antibiótico recibido ya sea profilaxis antibiótica o una dosis igual o mayor a 24 horas podría afectar la presencia e índice de microorganismos en las muestras. En 20 o 100% de las muestras de tejido enfermo los pacientes recibieron antibiótico antes de la cirugía, de las cuales 16 presentaron microorganismos. Se hizo un análisis de la dosis antibiótica frente a la presencia bacteriana y se determinó que la toma profiláctica de antibiótico tiene una probabilidad 1.36 veces mayor de presentar bacterias en las muestras de tejidos enfermos que la toma de antibiótico por un tiempo mayor o igual a 24 horas. Sin embargo esta probabilidad no fue estadísticamente significativa. En varios estudios similares, el criterio de exclusión de la muestra fueron pacientes que hayan recibido dosis antibiótica previa a la cirugía perirradicular (Saber, 2012), (Signoretti, 2013), sin embargo el presente estudio incluyó pacientes con toma de antibiótico y como los resultados lo demuestran igual se pudo identificar presencia bacteriana en los tejidos enfermos de todos los pacientes que tomaron sulfamicilina antes de la intervención. Estos resultados se ven apoyados en otros estudios semejantes que también incluyeron en la muestras pacientes con toma de antibiótico

previa como el de Sunde (2002) y el mencionado por Fouad (2009) lo cuales presentaron presencia de microbiota.

La identificación de *E. faecalis* en las lesiones periapicales refractarias es referida por otros estudios como el de Subramanian & Mickel, 2009 que reportó que *E. faecalis* fue la especie de mayor incidencia en las muestras con el 14.6%, también el estudio de Siqueira y Rocas señaló a *E. faecalis* como el mayor responsable de la persistencia de la lesión periapical y fue identificado en 64% de la muestras (2004). Igualmente, otros estudios reportan la presencia de esta bacteria en el 75% (Socransky, 2002), en el 64% (Stewart, 2001), en el 75% (Sunde, 2012) y en el 74% de las muestras (Sedgley et al, 2006).

En cuanto a la presencia de *C. albicans*, esta especie también está identificada en varias investigaciones de lesiones periapicales refractarias. En el estudio de Zang (2010) se manifiesta en 80% de las muestras, en el estudio de Sunde (2002) en el 75%, en el estudio de Socransky (2002) en el 75% de las muestras, en el estudio de Peciuliene (2001) en el 50% y en el 9% de las muestras en el estudio de Siquiera & Rocas (2004). A pesar de los estudios mencionados, otros como el de Baumgartner (2000) y Waltimo (2003) no encontraron presencia de esta levadura en las muestras de lesiones periapicales refractarias. Esto se contradice con el presente estudio en el que se identificó en el 20% de las muestras presencia de *C. albicans*. Aparte de lo mencionado, la presencia de *C. albicans* y *E. faecalis* en este tipo de lesión es referida por el estudio de Stewart y Corterton (2001) que manifiesta que en 5 de 8 muestras de tejidos periapicales de pacientes que recibieron antibiótico previo a la cirugía se identificaron *C. albicans*, *E. faecalis*, especies de *Pseudomonas* y *Estafilococcus* (Fouad, 2009). Esto hace referencia a la investigación presente ya que todas las muestras positivas tanto para *E. faecalis* como para *C. albicans*

fueron tomadas de pacientes que recibieron antibiótico previo a la intervención quirúrgica. Además de las referencias que enfatizan y mencionan el rol de *C. albicans* y *E. faecalis* en la persistencia de la lesión periapical refractaria, es importante destacar que su presencia y resistencia se debe a sus factores de virulencia por lo que también fueron seleccionados para ser identificados en este estudio. Entre las características de *C. albicans* se destacan su capacidad de adaptarse en diferentes medios incluso anaerobios a pesar de su naturaleza aerobia, la producción de proteasas, producción de proteinasas SAPS (Secreted Aspartyl Proteases), secreción de fosfolipasas, su polimorfismo, su habilidad de adherencia a diversas superficies epiteliales, su capacidad de coagregarse con otros microorganismos lo cual se corrobora también en este estudio ya que las cuatro muestras positivas para *C. albicans* se asocian con la presencia de cocos Gram + y cocos Gram -. Aparte de lo mencionado, también tienen la facultad de formar biofilm con diversos microorganismos lo cual hace más difícil la penetración de los medicamentos y acción de las células de defensa hacia el organismo. Por otro lado las características de *E. faecalis* que le hacen uno de los principales candidatos para la persistencia de la lesión es su capacidad para estar en pHs altos que le hace resistente a los medicamentos utilizados en el tratamiento, también presenta diversos factores de virulencia como: proteínas de superficie, serina proteasa, proteínas de unión al colágeno y de adherencia. Además secreta gelatinasa y citolisinas, produce super-óxido lo cual favorece a las infecciones mixtas y tiene la facultad de transferir copias de sí mismos de una célula bacteriana a otra por medio de péptidos los cuales están involucrados en la diseminación de la resistencia antibiótica (Fouad, 2009). Esto también se puede ver reflejado en este estudio ya que se presentó *E. faecalis* en 3 muestras de tejido enfermo a pesar de que los pacientes recibieron antibiótico y también se asoció esta especie con la presencia de bacilos Gram + en todas las muestras lo cual

verifica su capacidad de coagregarse con otra microbiota. Adicionalmente, una muestra del estudio correspondiente a tejido enfermo (SPE12) dio resultados positivos para *C. albicans* y *E. faecalis* en el análisis molecular y la tinción Gram reflejó la asociación de estos microorganismos con cocos Gram +, cocos Gram - y bacilos Gram + demostrando nuevamente la capacidad de coagregarse de las dos especies (tabla 21).

Por otro lado, 4 o el 20% de muestras de tejido enfermo no amplificaron para el 16 S ni para el gen de *C. albicans*, tampoco revelaron presencia de microorganismos en la tinción Gram lo cual puede deberse a que la persistencia de la lesión se haya provocado por otros factores que no involucren microorganismos en los tejidos periapicales. Estos como se mencionan anteriormente pueden ser por la presencia de cristales de colesterol en los tejidos apicales, por la presencia de un quiste verdadero o por la presencia microbiana dentro de los conductos obturados lo cual causa el fracaso del tratamiento endodóntico (Zuolo, M. et al, 2012).

Para determinar el número de microorganismos identificados en las muestras, se calculó también la media de tipos de microorganismos en los tejidos enfermos la cual fue 2.57. Este valor fue estadísticamente significativo con lo que se puede establecer que en las lesiones periapicales refractarias se presentó más de un tipo microorganismo y se observó de 2 a 5 tipos de microorganismos, pertenecientes a la familia de cocos Gram +, cocos Gram -, bacilos Gram +, bacilos Gram - y levaduras. De estos predominó la presencia de cocos Gram + en 80% de los casos, cocos Gram - en el 70%, bacilos Gram + en el 65%, bacilos Gram - en el 15% y *C. albicans* en 15% de los casos. De acuerdo a lo anterior, 40% de las muestras asoció 3 tipos de microorganismos, 20% presentó 2 tipos, 10% presentó 4 tipos y 10% reveló 5 tipos de microorganismos. Lo establecido anteriormente determina la

naturaleza poli-microbiana de la lesión periapical refractaria lo cual tiene una gran relevancia clínica tanto en el tratamiento intraconducto como en el antibiótico. Se calculó también la media de microorganismos en pacientes asintomáticos y sintomáticos, las cuales fueron 2,53 y 2,47 respectivamente. Sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente significativos ya que $p > 0.05$

En cuanto a los pacientes sintomáticos, se realizó un análisis OR para establecer la asociación de los microorganismos identificados con la presencia de síntomas. Todos los microorganismos aumentaron la probabilidad de presentar síntomas, sin embargo ninguna de estas probabilidades fue estadísticamente significativa con lo que no se pudo establecer que la presencia de microbiota específica es un factor causal de síntomas.

Se analizó también la especificidad y sensibilidad de las técnicas utilizadas en este estudio para identificar los microorganismos, se relacionó la tinción Gram con el análisis molecular por medio de PCR y se estableció que la tinción Gram en cuanto a la presencia bacteriana presentó una sensibilidad de 80% lo cual demuestra la capacidad de la tinción Gram de identificar la presencia de bacterias en tejidos enfermos es decir los verdaderos positivos. La especificidad del 97% demuestra la capacidad de la técnica de identificar los tejidos sanos es decir los verdaderos negativos. Al ser los dos valores altos se puede decir que la validez de la tinción Gram frente al PCR es aceptada como prueba de identificación de bacterias. Por otro lado al comparar la identificación de levaduras por medio de la tinción Gram con el análisis molecular de *C. albicans* se estableció 5% de sensibilidad y 100% de especificidad. Esto demuestra que la capacidad de la técnica de identificar levaduras en los tejidos enfermos fue baja es decir no identificó adecuadamente los verdaderos positivos. Sin embargo la sensibilidad de la técnica fue del 100% lo cual demuestra la alta capacidad de identificar los tejidos sanos sin presencia de levaduras es

decir los verdaderos negativos. La sensibilidad tan baja en cuanto al reconocimiento de levaduras en los tejidos enfermos puede deberse a que el observador no identificó la presencia de este microorganismo en las muestras, como se conoce *C. albicans* es polimórfica lo cual hace que no sea tan fácil determinar una forma constante de la levadura. Esto hace que se pueda presentar de diversas maneras dificultando el reconocimiento de la misma en el estudio.

Con lo discutido anteriormente, a pesar de que en el año 1939 el investigador Kronfeld mencionó que “un granuloma no es un área donde las bacterias viven, sino un lugar en el que son destruidas” (Fouad, 2009), en la actualidad las avanzadas técnicas moleculares han logrado identificar no solo un tipo de microorganismo sino varios en las lesiones refractarias con lo que se determina la naturaleza polimicrobiana de la persistencia de la lesión. Sin embargo, a pesar de los estudios que corroboran la presencia bacteriana en los tejidos enfermos y consecuentemente su capacidad de adaptación y de causar inflamación en los tejidos, varios autores se niegan a aceptar estos resultados sosteniendo su posición en que los estudios que muestran presencia de microorganismos no seleccionaron los casos adecuadamente, contaminaron las muestras con el medio oral, no se diferenciaron microorganismos viables con las técnicas moleculares y que ciertas bacterias pudieron ser trasladadas del interior de los conductos hacia los tejidos durante la intervención quirúrgica. Entre estos autores se destacan Iwy, Wasfy, Vigil, Abou-Rass, Bogen, Zuolo y Nair. Nair publica en varios artículos su posición e incluso es citado por autores como Zuolo en su libro “Reintervención en Endodoncia” en el que destaca que Nair “considera válido aun el concepto de que generalmente las lesiones apicales no albergan bacterias en su interior” (Zuolo, M. et al, 2012). Se establece en esta posición que solo en las siguientes situaciones se puede encontrar presencia de microorganismos en los

tejidos periapicales: contaminación de los tejidos perirradiculares por fístulas o bolsas periodontales, casos de exacerbaciones en las que el proceso crónico se agudiza presentando síntomas, por materiales extruidos en la región apical y por presencia de Actinomicetes y Propionibacterium por su habilidad de adaptarse y colonizar los tejidos perirradiculares. Con lo establecido según la posición de Nair se enmarca aún más la controversia sobre este tema, en el que diversos autores y estudios tienen posiciones diferentes en cuanto a la presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares y su rol fisiopatológico con la enfermedad. Por lo tanto el presente estudio se realizó con los siguientes criterios para comprobar la presencia de microbiota en los tejidos periapicales y darle a esta una relación causal con la enfermedad:

- Se excluyó de las muestras piezas dentales con caries, fracturas, restauraciones inadecuadas, lesiones periodontales, materiales extruidos en la región apical y fístulas lo cual puede contaminar la muestra como lo establece Nair.
- Los pacientes realizaron enjuagues con gluconato de clorhexidina al 0.12% y también se realizó limpieza de la zona quirúrgica con la misma sustancia al 0.2% a fin de evitar la contaminación de la muestra con el medio oral como establecen otros autores que fue la falla en la toma de muestras.
- Se incluyó las muestras de pacientes tanto asintomáticos como sintomáticos a fin de comprobar que no hay presencia bacteriana solo en exacerbaciones o agudizaciones de la enfermedad.
- Se determinó la viabilidad de los microorganismos identificados con el PCR por medio de la tinción Gram la cual revela microorganismos vivos ya que conservan sus membranas celulares, esto se hizo a fin de contrarrestar la posición que las técnicas moleculares no puede identificar entre el ADN de microorganismos vivos

y muertos.

- Se identificó molecularmente microorganismos específicos como *C. albicans* y *E. faecalis* para comprobar que no solo especies como *Actinomyces* y *Propionibacterium* son lo suficientemente patógenas para adaptarse y establecerse en un medio como los tejidos perirradiculares.
- Se incluyó en el estudio un grupo control de tejidos sanos con el objetivo de compararlos con los tejidos enfermos y establecer así que la presencia microbiana en estos tejidos es un factor de riesgo para el desarrollo y persistencia de la enfermedad.

Con lo anteriormente expuesto se demuestra que a pesar de que todos los parámetros de Nair fueron respetados y que se modificó el protocolo del estudio en base a las críticas de varios autores en la toma de muestra y proceso de las mismas, se reconoció la presencia de microorganismos en la mayoría de casos periapicales refractarios tanto sintomáticos como asintomáticos. Adicionalmente, se identificó la naturaleza polimicrobiana de esta infección y se estableció que la presencia de microbiota es un factor causal para la persistencia de la lesión. Cabe recalcar que varias investigaciones de autores como Saber, Signoretti, Siqueira, Wang entre muchos otros apoyan los resultados y análisis de este estudio. La controversia sobre este tema seguramente continuará, sin embargo más relevante que defender una posición es seguir con la investigación en este campo por medio de las nuevas técnicas moleculares las cuales nos presentaran un nuevo panorama sobre la verdadera microbiología relacionada a las infecciones de origen endodóntico.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio “Análisis molecular y asociación causal de microorganismos presentes en lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico”, se comprobó la hipótesis planteada que establece que las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico que han sido resecaadas en cirugía perirradicular si van a mostrar presencia de microorganismos en los tejidos extra radicales al momento de realizar la tinción Gram y análisis molecular de ADN bacteriano, por el contrario los tejidos que no presenten lesión no tendrán presencia de microorganismos.

La verificación de la hipótesis se hizo cumpliendo con el objetivo general que fue demostrar la presencia e identificar el tipo de microorganismos en las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico. Los objetivos específicos de esta investigación también fueron alcanzados ya que se comparó la frecuencia de presencia bacteriana en los tejidos periapicales entre pacientes con lesión y sin lesión periapical refractaria, se comprobó que la presencia de los microorganismos identificados es un factor causal para la prevalencia de la enfermedad, se estableció que el ADN de los microorganismos identificados en las muestras es viable mediante la tinción Gram, se comparó el índice y presencia de microorganismos entre pacientes sintomáticos y asintomáticos con lesión periapical refractaria, también se comparó el índice y presencia de microorganismos entre pacientes con profilaxis antibiótica y antibiótico terapia mayor o igual a 24 horas y finalmente se identificó en los tejidos perirradiculares enfermos la presencia de microorganismos como *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* reportados según varios estudios como principales causantes del fracaso endodóntico.

En conclusión a pesar de que el punto de vista tradicional de la endodoncia establece que en la mayoría de casos las lesiones perirradiculares principalmente asintomáticas no deben manifestar presencia de microbiota, esta investigación revela la presencia de una infección de naturaleza polimicrobiana en la que predominan los cocos Gram +, cocos Gram - y bacilos Gram + en casos tanto asintomáticos como sintomáticos de lesiones refractarias, lo cual al comparar con la presencia casi nula de microorganismos en tejidos sanos se puede establecer que es un factor causal de la persistencia de la lesión. Al comprobar que la presencia de microorganismos es un factor predisponente para las lesiones periapical refractarias, es indispensable que se tome en cuenta la naturaleza polimicrobiana de este tipo de infección y su relevancia clínica para los pacientes. Al establecerse que tan solo el 50% de la flora oral puede ser cultivada, es esencial que las técnicas de investigación en microbiología oral se expandan y recurran a las técnicas moleculares más avanzadas las cuales nos ayudaran a identificar varias especies de microorganismos que antes no se tomaban en cuenta dando como resultado que los especialistas puedan desarrollar mejores tratamientos tanto clínicos como antibióticos. Todo esto a fin de contrarrestar la proliferación de microorganismos en los tejidos perirradiculares y prevenir la enfermedad.

10. RECOMENDACIONES

Los futuros estudios de los factores etiológicos de la periodontitis periapical refractaria deben tener un universo de muestras más amplio. Es importante también que en los próximos estudios se realice un análisis molecular del ADN de otros microorganismos relacionados con el fracaso del tratamiento endodóntico para tener un mejor panorama de la naturaleza poli-microbiana de la infección persistente. Se recomienda consecuentemente para estudios similares realizar pirosecuenciamiento de las muestras a fin de identificar de una forma más exacta el tipo de microorganismos y virus involucrados en la persistencia de la lesión perirradicular. Las investigaciones destacan entre ellos a: *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sp.*, *Prevotella intermedia*, *Porfimorona gingivalis*, *Porfimorona endodontalis*, *Treponema denticola*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Propionibacterium acnés* y virus como el citomegalovirus (HGMV) y Epstein Barr (EBV).

Sería interesante también tomar muestras de tejidos enfermos durante la cirugía de pacientes que no han recibido ningún tipo de terapia antibiótica para comparar con los pacientes que si la recibieron y poder analizar diferencias entre la presencia bacteriana de los tejidos de los dos grupos.

Finalmente otra recomendación trascendental para este estudio es que se realice un estudio histopatológico de las lesiones periapicales refractarias simultáneamente al análisis molecular de los tejidos a fin de buscar correlaciones entre el tipo de patología con la presencia de microorganismos en la misma y de esta manera poder asociar esta al fracaso de la endodoncia.

11. Trabajos citados

- Perera J., Tormo A., García J. (2002). *Ingeniería Genética*. Madrid: Sintesis.
- Apaydin, E., Shabahang, S. & Torabinajed, M. (2004). Hard Tissue Healing after application of fresh or set MTA as root end filling material. *JOE*, 30-40.
- Baumgartner, J. C. (2003). Antibiotic Susceptibility of Bacteria associates with endodontic abscesses. *JOE*, 44-47.
- Cheung, G. et al. (2003). Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 332-337.
- Cohen, S. & Burns, R. (2011). *Vias de la pulpa*. Madrid: Elsevier.
- Fouad, A. (2009). *Endodontic Microbiology*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Fouad, A. et al. (2002). PCR-based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 3223-3231.
- Friedman, S. & Mor, C. . (2004). The succes of endontic therapy, healing and functionality. *Calif Dental Assoc journal*, 493-503.
- Gaetti, E. et al. (2010). Microbiota Associated with Chronic Osteomyelitis of the Jaws. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1056-1063.
- Gay Escoda, C. & Berini, L. (2004). *Cirugía Bucal*. Barcelona: Océano.
- Gomes, B. et al . (2006). Molecular Analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsithia and Treponema denticola associated with failed endodontic treatment. *JOE*, 937-950.
- Henriques, L. et al . (2011). Citokyne Analysis in Lesions Refractory to Endodontic Treatmente. *JOE*, 1659-1662.
- Ingle, J. (2004). *Endodoncia*. Mexico D.F.: Interamericana.
- J. Sapp, L. Eversole, G. Wysocki. (2005). *Patología Oral y Maxilofacial*. Madrid: Elsevier.
- Kaetzke, A. et al. (2003). Oral actinomyces Isolates Forming Red Colonies on Brain Heart Blood Agar can be unambiguosly classified as A. odontolyticus by Macroscopic Examination. *Journal of Clinical Microbiology*, 3729-3331.
- Leyva, E., Tapia, J., Quezada, D. Ortiz, E. (2006). Factores involucrados en el desarrollo y expansión del quiste periapical. *Revista odontológica Mexicana*, 36-41.
- Marcos, J. L. (2000). Etiología, clasificación y patología pulpar y periapical. *Med. Oral y Patología Oral*.
- Montes, M. (2003). Consideraciones del uso de Antibioticos en infecciones odontogénicas. *ADM*, 185-192.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Elsevier.
- Nair, P. (2006). On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Journal of Endodontics*, 249-281.
- Nair, PNR. & Figdor, U. (1999). Persistent periapical radiolucencies of root filled human teeth, failed endodontic treatments and periapical scars. *Oral sur Oral med Oral patho*, 617-627.

- Noiri, Y. et al. (2002). Participation of Bacterial Biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *JOE*, 679-683.
- Oliveira, R., Carvalho, B., Soares, L. . (2004). Comparative immunohistochemical study of presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol* , 59-63.
- Rahtnayake, I. et al . (2011). Genotyping of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates by use of a set of eight single nucleotide polymorphisms. *Journal of clinical microbiology*, 367-378.
- Raspall, G. (2006). *Cirugía Oral e Implantología*. Madrid: Médica Panamericana.
- Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación de l ARNr 16S: f u n d a m e n t o, metodología y aplicaciones. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 238-245.
- Saber, M. et al. (2012). Bacterial Flora of Dental Periradicular lesions analyzed by the 454 Pyrosequencing Technology. *JOE*, 50-65.
- Signoretto, F. et al. (2011). Persistent Extraradicular Infection in Root Filled Asymptomatic Tooth: Sacanign Electron Microscopic Analysis and Microbial Investigation after Apical Microsurgery. *JOE*, 1696-1700.
- Siqueira, F. & Roca, I. (2005). Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2-Redefining the Endodontic Microbiota. *JOE*, 488-456.
- Siqueira, J. & Roca I. (2004). Polymerase chain reaction analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral surg Oral med Oral pathol*, 85-94.
- Stewart, P. & Costerson J. (2001). Antibiotic Resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 135-138.
- Subramanian, K. & Mickel, A. (2009). Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions . *JOE*, 950-965.
- Sunde, O. & Trnstad, L. (2000). Assesment of periradicular microbiota by DNA hybridization. *JOE*, 191-196.
- Sunde, P. (2002). Microbiota of Periapical Lesion Refractory to Endodontic Therapy. *JOE*, 304-310.
- Torabinajed, M. & Machnick, T.K. (2005). Levels of evidence for the outcome of nonsurgical endodontic treatment. *JOE*, 637-646.
- Tronstad, L. & Sunde PT. (2003). The evolving new understanding of endodontic infection . *Endo Top*, 57-77.
- Von Arx, T., Peñarrocha, M., Jensen, S. (2010). Prognostic Factors in Apical Surgery with Root-end Filling: A meta-analysis. *JOE*, 957-962.
- Xia, T. & Baumgartner. (2003). Occurrence of *Actinomyces* in Infections of Endodontic Origin. *JOE*, 549-552.
- Zuolo, M. et al. (2012). *Reintervención en Endodoncia*. Sao Paulo: Santos.