

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE BIOFILM MULTIESPECIES ENDODÓNTICO *in vitro***

**Fase I**

**Camila Paola Jaime Romero**

**Valentina Moreno Arenas**

**Daniel Clemente Sanabria Pulido**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

**PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**BOGOTÁ DC.- JUNIO 2021**

## HOJA DE IDENTIFICACIÓN

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Odontología
<b>Título:</b>	Estandarización de un modelo de biofilm multiespecies endodóntico <i>in vitro</i> Fase I
<b>Grupo de Investigación:</b>	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
<b>Línea de investigación:</b>	Microbiología oral
<b>Otra(s) institución(es) participante(s):</b>	Apisred SAS; Prodont Scientific SAS
<b>Tipo de investigación:</b>	Pregrado /GRUPO
<b>Estudiantes</b>	Camila Paola Jaime Romero Valentina Moreno Arenas Daniel Clemente Sanabria Pulido
<b>Director:</b>	Yormaris Castillo Romero
<b>Codirector</b>	Nathaly Andrea Delgadillo Salgado
<b>Asesor Metodológico:</b>	Gloria Inés Lafaurie Villamil
<b>Asesor estadístico:</b>	Gloria Inés Lafaurie Villamil

## DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

<b>OTTO BAUTISTA GAMBOA</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL GALVIS</b>	Rector(a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>CRISTINA MATIZ MEJIA</b>	Secretaria General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ</b>	Director Área Bioclínica
<b>ALEJANDRO PERDOMO RUBIO</b>	Director Área Comunitaria
<b>JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES</b>	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios y a nuestros padres por darnos la oportunidad de estudiar en una importante y reconocida universidad como lo es la Universidad El Bosque, a esta institución por permitirnos hacer parte de la facultad de Odontología y brindarnos todo lo necesario para formarnos como profesionales integrales, al Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) y a la Dra. Gloria Lafaurie por abrirnos sus puertas y permitirnos llevar a cabo este proyecto de investigación en dirección de la Dra. Yormaris Castillo Romero y co-dirección de la Dra. Nathaly Andrea Delgadillo Salgado, quienes desde el primer momento fueron una gran guía y apoyo para poder realizar nuestro proyecto brindándonos sus amplios conocimientos, tiempo, dedicación y paciencia; agradecemos de igual manera a nuestro asesor metodológico, la Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil por habernos guiado y acompañado con sus conocimientos y recomendaciones durante nuestros años de formación. De igual manera agradecemos a nuestros compañeros por el esfuerzo, dedicación y paciencia que se generó en todo este tiempo.

## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo antes que nada a Dios por ser nuestro guía durante todos estos años de estudio, a nuestros padres y hermanos quienes nos brindaron su apoyo incondicional, palabras de aliento cuando las cosas se complicaron y lo más importante, su confianza en nosotros, gracias por su esfuerzo y dedicación para ayudarnos a cumplir nuestro sueño de ser odontólogos porque sin ellos nada de esto sería posible.

Igualmente queremos dedicar este trabajo a la Dra. Yormaris Castillo Romero y la Dra. Nathaly Andrea Delgadillo Salgado quienes hace más de 2 años aceptaron comenzar con nosotros este proyecto que hoy culmina y siempre de la mejor manera nos brindaron todo lo que necesitábamos para llevarlo a cabo. Estamos muy agradecidos por todo lo que hicieron por nosotros y siempre las recordaremos con mucho cariño.

## GUIA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pags.
1.	
2. Introducción	
3. Marco teórico	3
4. Planteamiento del problema	13
5. Justificación	15
6. Situación Actual	16
7. Objetivos	17
8. Metodología del Proyecto	18
7.1 Tipo de estudio	18
7.2 Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	18
7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información	18
7.4 Hipótesis de estudio	21
7.5 Plan de tabulación y análisis.	22
9. Consideraciones éticas.	23
10. Resultados	24
9.1 Fase descriptiva	24
9.2 Fase analítica	26
11. Discusión	29
12. Recomendaciones	32
13. Conclusiones	33
14. Referencias bibliográficas	34

## LISTADO DE TABLAS

	<b>Págs.</b>
<b>Tabla 1</b> Longitud de onda y rangos de densidad óptica ajustados para cada bacteria en el biofilm. Tabla diseñada por Yormaris Castillo.	18
<b>Tabla 2</b> Promedios de recuentos de inóculos bacterianos expresados en Log 10. Tabla diseñada por Yormaris Castillo.	24
<b>Tabla 3</b> Recuento de biofilm a los 3, 7 y 14 días en Unidad formadora de colonias. Tabla diseñada por Yormaris Castillo.	25

## LISTADO DE FIGURAS

	Págs.
<b>Figura 1</b> Diagrama de las etapas de la formación de la biopelícula. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.	8
<b>Figura 2</b> Muestra histológica de un tercer molar extraído con caries extensas que alcanzan la pulpa. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.	9
<b>Figura 3</b> Visualización de formaciones de biopelículas en las paredes del conducto radicular de un diente extraído con una lesión de tejido periapical adherida. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.	10
<b>Figura 4</b> Identificación mediante MALDI-TOF MS de <i>E. faecalis</i> . Tomada por Nathaly Delgadillo.	25
<b>Figura 5</b> Análisis de biomasa en condiciones de crecimiento a los 3, 7 y 14 días de formación. Diseño de gráfica por Yormaris Castillo.	26
<b>Figura 6</b> Porcentaje de viabilidad bacteriana de biofilm sobre láminas de vidrio a los 3, 7 y 14 días. Diseño de gráfica por Yormaris Castillo.	27
<b>Figura 7</b> Análisis de viabilidad y microscopía de fluorescencia en los diferentes tiempos de formación de biofilm. Imágenes capturadas con el sistema Apotome 2.0.	28

## RESUMEN

### ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE BIOFILM MULTIESPECIES ENDODÓNTICO *in vitro*. Fase I

**Introducción:** La infección endodóntica primaria ocurre por colonización de microorganismos del género *Streptococcus spp*, *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*, *Campylobacter spp*, *Capnocytophaga spp* y *Actinomyces spp*. El propósito del tratamiento endodóntico es eliminar la pulpa, lograr una desinfección completa del conducto radicular mediante irrigantes y medicamentos; sin embargo, esto no siempre es exitoso. Por ello, es necesario implementar modelos de biopelículas multiespecies endodónticas que permitan a futuro evaluar la eficacia de sustancias antimicrobianas durante el tratamiento de infecciones endodónticas. **Objetivo:** Desarrollar y estandarizar un modelo de biofilm multiespecies endodóntico *in vitro*. **Materiales y métodos:** Se estandarizó un modelo de biofilm multiespecies endodóntico *in vitro* sobre láminas de vidrio. Se preparó una mezcla de bacterias con *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012, *S. oralis* ATCC 35037, *P. endodontalis* ATCC 35406, y *E. faecalis* ATCC 29212 ajustados espectrofotométricamente a  $1 \times 10^8$  bacterias/mL. 400µL de la mezcla de bacterias, se inoculó por pozo sobre láminas de vidrio. Se formaron biopelículas de 3, 7 y 14 días a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Se verificó viabilidad después de cada tiempo de formación mediante plaques en agar Brucella, sangre y BHI. La biomasa del biofilm fue calculada mediante el método de cristal violeta y el porcentaje de viabilidad bacteriana se determinó usando el kit (LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability, Molecular Probes®). Se realizó análisis por MALDI-TOF para verificar identidad de colonias con fenotipo variable en el biofilm. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en experimentos independientes. **Resultados:** Se evidenció crecimiento de *S. oralis* y *E. faecalis* en los 3 tiempos de formación; *A. israelii* sólo creció a los 7 días, *P. endodontalis* solo creció a los 14 días de formación de biofilm y *F. nucleatum* no creció en ningún tiempo de incubación. La biomasa del biofilm disminuye conforme avanza el tiempo y el porcentaje de viabilidad es similar en los 3 tiempos. **Conclusión:** Se formaron biopelículas multiespecies endodónticas con un porcentaje de viabilidad alto y encontrando una reducción de la biomasa del biofilm conforme aumentan los días de formación. **Palabras clave:** Infección endodóntica primaria, biofilm, bacterias, cristal violeta, viabilidad.

## ABSTRACT

### STANDARDIZATION OF A MULTISPECIES ENDODONTIC BIOFILM MODEL in vitro Phase I

**Introduction:** Primary endodontic infection occurs due to colonisation of *Streptococcus spp*, *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*, *Campylobacter spp*, *Capnocytophaga spp* and *Actinomyces spp*. The purpose of endodontic treatment is to eliminate the pulp and achieve complete disinfection of the root canal by means of irrigates and medication. However, this is not always successful. It is necessary to implement endodontic multi-species biofilms, which allow the evaluation of the efficiency of anti-microbial substances during infectious treatment. **Objective:** To develop and standardize an in vitro endodontic multi-species biofilm model. **Materials and methods:** A model was standardized as mentioned above on a glass plate. A mixture with *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012, *S. oralis* ATCC 35037, *P. endodontalis* ATCC 35406 and *E. faecalis* ATCC 29212 was prepared spectrophotometrically adjusted to  $1 \times 10^8$  bacteria/mL. 400 $\mu$ L of said mixture was inoculated on a glass plates. Biofilms formed after 3, 7 and 14 days at 37 °C in anaerobic conditions. Viability was verified after each development period with samples in Brucella agar, blood and BHI. The biofilm's biomass was calculated with the crystal violet method and percentage was determined using the (LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability, Molecular Probes®) kit. An analysis with MALDI-TOF was performed in order to verify the phenotype colonies in the biofilm and all tests were carried out in independent triplicate experiments. **Results:** Growth of *S. oralis* and *E. faecalis* was evidenced during the three growth periods; *A. israelii* only grew after seven days and *P. endodontalis* after 14. *F. nucleatum* did not grow during any incubation period. The biofilm's mass diminishes as time progresses and the viability was similar for the three periods. **Conclusions:** endodontic multi-species biofilms with high viability were formed; mass was reduced as development time progressed. **Key words:** primary endodontic infection, biofilm, bacteria, crystal violet, viability.

## 1. INTRODUCCIÓN

La infección endodóntica primaria es una infección polimicrobiana caracterizada por la invasión y colonización del tejido pulpar necrótico predominantemente por microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos del género *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, y *Actinomyces*. Esta infección ocurre principalmente como consecuencia de lesiones de caries que avanzan hasta permitir la migración de microorganismos al tejido pulpar ocasionando una infección y posteriormente una necrosis; siendo el tejido pulpar necrótico, un ambiente favorable para el crecimiento de las bacterias (Siqueira *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2012). Estas infecciones se han clasificado según la localización anatómica como infección intrarradicular e infección extrarradicular. La infección endodóntica intra-radicular de acuerdo con el tiempo de entrada de los microorganismos al conducto radicular se ha clasificado en: **1)** Infección intra-radicular primaria, la cual es causada por microorganismos que logran invadir y colonizar inicialmente la pulpa dental que se ha necrosado. **2)** Infección intra-radicular secundaria, es causada por los microorganismos que no hacen parte en la infección primaria pero que invaden el conducto radicular tiempo seguido a la intervención profesional. **3)** Infección intra-radicular persistente, ocurre cuando los microorganismos implicados en la infección primaria y secundaria logran resistir los procedimientos antimicrobianos intraconducto y pueden soportar períodos de ausencia de nutrientes dentro de los conductos radiculares que han sido tratados.

La infección extrarradicular es caracterizada por bacterias que invaden los tejidos periapicales como secuela de una infección intra-radicular (Siqueira *et al.*, 2011). Aunque la mayoría de las bacterias que invaden el conducto radicular son removidas por la preparación químico-mecánica durante el tratamiento endodóntico, son difíciles de erradicar completamente (Siqueira *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2018). Peters *et al.*, 2001, reportaron que cerca del 35% del área de la superficie de los conductos quedaron intactas después de la instrumentación tanto manual como rotatoria (Peters *et al.*, 2001). Las bacterias que sobreviven pueden usar el tejido pulpar necrótico remanente como fuente nutricional y ha sido reportado que los microorganismos pueden permanecer dentro de los túbulos dentinales aún después de realizada la instrumentación mecánica (Akpata *et al.*, 1982; Love *et al.*, 2002; Love *et al.*, 2001).

Para eliminar la infección endodóntica, es necesario eliminar por completo la pulpa de un diente no vital y realizar una preparación químico-mecánica del sistema de conductos que

garantice la desinfección completa del conducto mediante el uso de diferentes irrigantes (Siqueira *et al.*, 2007). Se ha reportado que, en la infección primaria cuando las bacterias invaden los túbulos dentinarios no son invadidos en la misma proporción. Tanto observaciones *in vitro* como *in vivo* muestran que la penetración bacteriana en los túbulos dentinarios ocurre como proceso aleatorio, con colonias bacterianas vistas como acumulaciones esporádicas y densas de células (más que como película continua), que se extiende desde el canal principal hacia la periferia (Mohammadi A *et al.*, 2013).

Cuando se desarrolla una infección del conducto radicular, la predentina se infecta fácilmente, pero la dentina calcificada es menos fácil de infectar. Las especies bacterianas que penetran en la dentina son dominadas por bacilos Gram positivos (68%) y cocos (27%). Los géneros predominantes son *Lactobacillus* (30%), *Streptococcus* (13%) y *Propionibacterium* (9%). La presencia de bacterias Gram negativas ha sido confirmada indirectamente por la detección de altas concentraciones de lipopolisacárido (LPS) en las capas interiores de hasta 300µm de profundidad (Mohammadi A *et al.*, 2013). Se han descrito diferentes tipos de estructuras en las biopelículas endodónticas; la primera de ellas corresponde a la vista plana y tradicional, denominada modelo de la biopelícula densa.

El segundo tipo de estructura se definió como modelo del mosaico heterogéneo y fue descrito al estudiar el interior de los conductos radiculares en los túbulos dentinarios. El tercer tipo de estructura que representa el concepto actual de biopelícula está denominado como el modelo tulipán o champiñón, o modelo de los canales de agua. Este modelo revela una estructura común no sólida, en forma de champiñón o tulipán con el tallo más estrecho que su porción superior. (Wimpenny y Colasanti 1997; Wimpenny *et al.*, 2000; Donlan, 2002). La evidencia actual no es completamente clara sobre el proceso de colonización y formación de biofilm de los microorganismos asociados a la infección endodóntica intra-radicular primaria.

En este sentido y para la mejor comprensión de los procesos biológicos relacionados con la infección primaria este trabajo tiene como propósito desarrollar un modelo de biofilm endodóntico multiespecies *in vitro* sobre láminas de vidrio. Estas investigaciones son indispensables para entender la dinámica de comunidades microbianas asociadas a biofilm y a futuro emplear estos modelos para la evaluación de sustancias antimicrobianas necesarias para el manejo de la infección endodóntica.

## **2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL**

### **2.1 Anatomía del sistema de conductos radiculares**

El sistema de conductos radiculares está conformado por tejido conectivo que corresponde a la pulpa, la cual se encuentra albergada en el espacio del conducto radicular, compuesta por proteoglicanos, proteínas no colágenas, células inflamatorias y una red microvascular que suministra el flujo sanguíneo encargada de brindar vitalidad al diente, la cual puede suplir las necesidades nutricionales bacterianas cuando se presenta contaminación (Hodosh.,1983; Goldberg *et al.*, 2017).

Este sistema se caracteriza por presentar una amplia variación morfológica. Típicamente los premolares inferiores muestran una sola raíz y un conducto amplio vestíbulo lingual, sin embargo, se han reportado premolares con dos, tres, cuatro y cinco conductos radiculares. Además, se ha descrito que a nivel apical estos conductos presentan istmos, extensiones laterales, deltas apicales, canales laterales y túbulos dentinales (Versiani *et al.*, 2012); Carotte *et al.*, en el 2004 describió la presencia de conductos radiculares en forma de C con una prevalencia 10,7% y 18% siendo estos de más difícil manejo en la clínica, ya que su forma dificulta el acceso biomecánico y el alcance del irrigador.

#### **2.1.1 Causas de infección del sistema de conductos radiculares**

Se evidencia en la literatura, que la infección de los conductos radiculares se debe a factores que conllevan a la contaminación de la pulpa dental, como la pérdida de las estructuras protectoras del diente, como esmalte y cemento debido a caries, traumas, grietas o intervención dental (Swimberghe *et al.*, 2019).

Al perder las estructuras protectoras, los microorganismos comienzan a adherirse a las paredes del conducto radicular mediante las adhesinas de superficie. Debido a la complejidad y variación morfológica de los conductos radiculares, estos se convierten en refugio para los microorganismos en donde la acción de los instrumentos y desinfectantes no es del todo efectiva. Por lo tanto, una vez que las células microbianas resisten, deben ser capaces de utilizar los nutrientes disponibles en la pulpa, competir o cooperar con otras especies en el

medio ambiente, para iniciar de esta manera la división celular y colonización bacteriana (Love, 2004).

Por otra parte, los microorganismos al superar los agentes de defensa de la pulpa causan infecciones endodónticas de diferentes tipos, que resultan inicialmente en pulpitis, posteriormente en necrosis pulpar y progresa a enfermedad periapical inflamatoria (Love, 2004).

### **2.1.1.2 Clasificación de las infecciones endodónticas**

Las infecciones endodónticas, se han clasificado según la localización anatómica como infección intra-radicular e infección extra-radicular. La infección endodóntica intra-radicular de acuerdo con el tiempo de entrada de los microorganismos al conducto radicular se ha clasificado en: **1)** Infección intra-radicular primaria, la cual es causada por microorganismos que logran invadir y colonizar primeramente la pulpa dental que se ha necrosado. **2)** Infección intra-radicular secundaria, es causada por los microorganismos que no hacen parte en la infección primaria pero que invaden el conducto radicular tiempo seguido a la intervención profesional. **3)** Infección intra-radicular persistente, ocurre cuando los microorganismos implicados en la infección primaria y secundaria logran resistir los procedimientos antimicrobianos intra-conducto y pueden soportar períodos de privación de nutrientes dentro de los conductos radiculares que han sido tratados. La infección extra-radicular es caracterizada por bacterias que invaden los tejidos periapicales como secuela de una infección intra-radicular (Siqueira *et al*, 2011).

La infección endodóntica primaria es una infección polimicrobiana caracterizada por la invasión y colonización del tejido pulpar necrótico predominantemente por microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos del género *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, y *Actinomyces*. Esta infección ocurre principalmente por lesiones de caries que avanzan hasta permitir la migración de microorganismos al tejido pulpar ocasionando una infección y posteriormente una necrosis (Siqueira, 2002; Gómez *et al.*, 2012). La evidencia indica que las bacterias pueden cambiar su comportamiento y volverse más virulentas por el estrés ambiental generado por el pH, temperatura y densidad de población (Siqueira, 2002).

Siguiendo con la clasificación de las infecciones endodónticas, la infección secundaria es aquel proceso infeccioso causado por microorganismos que no están presentes durante la infección primaria y que son introducidos durante el tratamiento endodóntico, entre citas o una vez finalizada la endodoncia. Si los microorganismos que ingresan son capaces de sobrevivir y colonizar el sistema de conductos, se establece una infección endodóntica secundaria; la literatura reporta estudios en los que se demuestra que la microbiota de las infecciones secundarias suelen ser bacterias Gram positivas facultativas, siendo *Enterococcus faecalis* la especie predominante (Siqueira y Rocas, 2005). Este tipo de infecciones son causa de las lesiones perirradiculares que pueden provocar síntomas, exudado purulento y fracaso del tratamiento endodóntico (Siqueira, 2002).

Por otro lado, la infección endodóntica persistente, es la infección que se da por la resistencia que presentan los microorganismos a procesos antimicrobianos, es decir, que después de los procedimientos de irrigación y medicación intraconducto, los microorganismos que lograron sobrevivir; la microbiota asociada con este tipo de infección generalmente se compone de una sola especie o un número de especies menor que en una infección endodóntica primaria (Siqueira, 2002). Se evidenció la presencia de géneros como *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, y *Veillonella* (Siqueira y Rocas, 2005).

Por último, se encuentra la infección endodóntica extraradicular, su forma más frecuente es el absceso periapical que se produce cuando las bacterias logran pasar a los tejidos perirradiculares. La causa de la infección endodóntica extraradicular, es una infección intraradicular ya sea primaria, secundaria o persistente (Siqueira, 2002). Autores plantean que durante el re-tratamiento de estos casos, el uso de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) en combinación con otros desinfectantes, tales como clorhexidina, presentan un espectro más amplio de actividad antimicrobiana, por lo tanto, tienen el potencial de ser más eficaces en estos casos ya que los microorganismos establecidos en los tejidos perirradiculares son inaccesibles en los procedimientos de desinfección endodóntica (Siqueira *et al.*, 2007).

En este estudio nos centraremos en la infección endodóntica primaria ya que es la primera fase de infección dentro del sistema de conductos y si se trata de manera adecuada, se podrá

evitar y reducir las infecciones endodónticas secundarias y persistentes, así como los fracasos en tratamientos de conductos.

## **2.2 Microbiología de las infecciones endodónticas primarias**

La literatura reporta que la infección endodóntica primaria se da principalmente por la colonización de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos del género *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* y *Actinomyces* (Siqueira, 2002). Así mismo, varios autores describen las especies del género *Actinomyces* involucrados en infecciones endodónticas primarias del sistema de conductos radiculares; la prevalencia de las diferentes especies reportadas es: *Actinomyces odontolyticus* un 31,3%, *Actinomyces naeslundii* un 9,4%, *Actinomyces israelii* un 6,3% y *Actinomyces gerencseriae* un 3,1% (Tang *et al.*, 2003).

Por otro lado, estudios como el de Siqueira *et al.*, 2001 describen que las bacterias negro-pigmentadas más frecuentemente encontradas en infecciones endodónticas son *Porphyromonas endodontalis* en un 70%, *Porphyromonas gingivalis* con 40% y *Prevotella intermedia* con un 10%, sugiriendo que estas pueden jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Siqueira *et al.*, 2001). Así mismo, en un estudio realizado por Fouad *et al.*, 2003 demostraron una alta frecuencia de *Fusobacterium nucleatum* con un 82%, *Peptostreptococcus micros* con un 50%, *Porphyromonas endodontalis* con 55%, *Streptococcus* spp con 41% y *Prevotella nigrescens* en un 32% sobre otros microorganismos involucrados en infecciones endodónticas primarias (Fouad *et al.*, 2003; Lana *et al.*, 2001).

Se conoce que la infección de los conductos radiculares no ocurre por colonias separadas o bacterias planctónicas, sino que se da en forma de comunidades unidas a las paredes del conducto radicular y están incrustadas dentro de una matriz extracelular de producción propia, lo que las hace mucho más tolerantes a la mayoría de los antimicrobianos (Siqueira y Rocas, 2009; Ricucci y Siqueira, 2010; Bjarnsholt 2013).

Para que las bacterias trabajen en forma de comunidad, se requiere de un mecanismo de comunicación entre ellas conocido como Quórum sensing, el cual les permite la regulación de propiedades bacterianas como la virulencia, hacer frente al estrés ambiental y la capacidad de formar biopelículas; debido a que muchas de las bacterias que se encuentran en los conductos

radiculares como lo son: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia* poseen la capacidad de comunicarse a través del quórum sensing, es probable que estas señales actúen como factores ambientales que alteran la expresión génica para optimizar las propiedades de las bacterias en biopelículas de los conductos radiculares (Svensäter y Bergenholtz, 2004).

La evidencia científica reporta que se han desarrollado biopelículas producidas experimentalmente con cultivos mixtos de bacterias en donde se han observado canales radiculares que sugieren la formación de un biofilm dentro del sistema de conductos, aunque las condiciones bajo las cuales ocurre la formación de este biofilm endodóntico y las medidas que deben tomarse para su erradicación, no se conocen muy bien. Esto hace importante la estandarización del biofilm endodóntico multiespecie para futuros escenarios clínicos ya que se ha encontrado que las bacterias tienen la capacidad de volverse más virulentas y ser más resistentes a agentes antimicrobianos cuando crecen en comunidad (Svensäter y Bergenholtz, 2004).

### **2.2.1 Etapas de formación de un biofilm endodóntico multiespecies.**

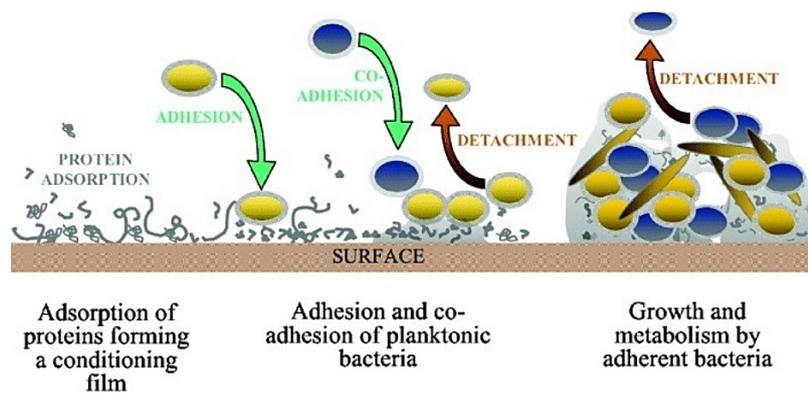
El proceso de formación del Biofilm en el conducto radicular no es aún muy conocido. La teoría más aceptada consta de cuatro fases como se describen en la figura 1 descrita por Svensäter y Bergenholtz.

En la primera fase se forma una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos derivados de las bacterias en suspensión, del proceso inflamatorio y/o necrótico.

La segunda fase, se da sobre esa película pegajosa, en donde se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión como *Fusobacterium nucleatum*, quien es el componente central de muchos de los biofilms en infecciones odontogénicas por su enorme capacidad de coagregación (Ozok *et al.*, 2007); autores postulan que es la bacteria clave o “puente” para el desarrollo del biofilm, junto con el *Streptococcus intermedius*, siendo esta una de las más importantes en la formación de biofilm, ya que describen una gran capacidad adhesiva y postulan que incluso puede ser una de las especies primarias, generadoras de biofilm de igual manera se ha descrito como una de las bacterias que se aísla comúnmente en infecciones endodónticas (Tarsi y Corbin 1998).

Durante la tercera fase, en la primera capa de bacterias ya adheridas, se segrega mediadores que van fijando más y más bacterias, de esa estirpe o de otras; al mismo tiempo que va formando la matriz extracelular de polisacáridos, primera barrera defensiva característica del biofilm (Svensäter y Bergenholtz, 2004).

En la cuarta y última, el biofilm va madurando y creando sistemas de defensa más complejos. Al mismo tiempo, arroja bacterias al exterior que cronifican la respuesta inflamatoria del huésped (Svensäter y Bergenholtz, 2004). Autores exponen que en esta etapa el conjunto del biofilm puede consistir en 15% de bacterias y 85% de matriz de polisacáridos, además de contar con más de 300 capas de bacterias superpuestas (Siqueira y Rocas, 2009).



**Figura 1.** Diagrama de las etapas de la formación de la biopelícula. Se observan las cuatro fases: formación de película adhesiva, adhesión de bacterias planctónicas, crecimiento-metabolismo de las bacterias adheridas y maduración. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.

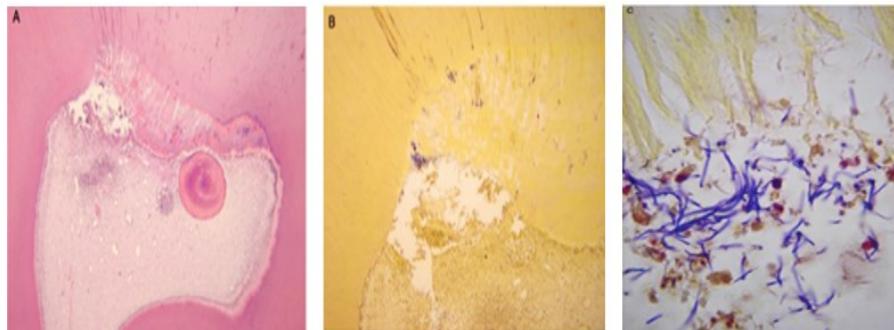
### 2.2.2 Modelos de biofilm

En la literatura, existen diferentes estudios que utilizan modelos de biopelícula *in vitro* para evaluar la formación de este, así como estudios que evidencian la presencia de bacterias en los con túbulos dentinales como se escribe figura 2.

En la mayoría de los estudios del biofilm se usan bacterias anaerobias facultativas como *Streptococcus del grupo Viridans*, mientras que la comunidad bacteriana en las infecciones primarias endodónticas está dominada por bacterias estrictamente anaerobias. Esta elección

de anaerobios facultativos es justificable ya que representan la mayoría de las infecciones persistentes, mientras que en un modelo multispecies, una combinación de especies anaerobias estrictamente y facultativas es más relevante (Swimberghe *et al.*, 2018).

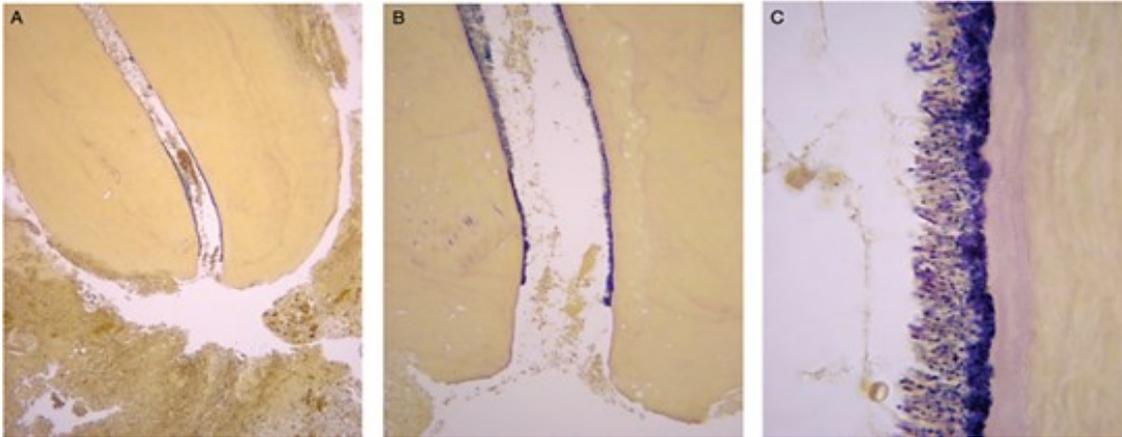
Es de esta manera que se han descrito al menos tres tipos de estructuras en las biopelículas; la primera de ellas corresponde a la vista plana y tradicional característica de la estructura homogénea, denominada modelo de la biopelícula densa, la cual fue introducida por los investigadores al estudiar la placa dental con microscopio electrónico de transmisión. Dichas observaciones mostraron numerosas microcolonias de bacterias de forma similar dentro de una estructura densa sin evidencia de canales de agua o poros atravesándola (figura 3) (Wimpenny y Colassanti, 1997).



**Figura 2.** Muestra histológica de un tercer molar extraído con caries extensas que alcanzan la pulpa. Descripción general A) se observa el sitio de penetración bacteriana y la respuesta inflamatoria del tejido asociada. B) Tinción para bacterias con un método Brown y Brenn modificado por Taylor, se observan bacterias en diferentes zonas. C) Magnificación de la fotografía B, muestra bacterias que entran en la pulpa. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.

El segundo tipo de estructura se definió como el modelo del mosaico heterogéneo y fue descrito al estudiar el interior de los conductos radiculares en los tubulillos dentinarios usando microscopio de contraste diferencial. Este modelo mostraba microcolonias juntándose en pilas sobre el sustrato, pero generalmente bien separada de sus vecinas (Wimpenny y Colasanti 1997; Wimpenny *et al.*, 2000).

**Figura 3.** Visualización de formaciones de biopelículas en las paredes del conducto radicular de un diente extraído con una lesión de tejido periapical adherida. La sección se tiñó con un



método Brown y Brenn modificado por Taylor para la identificación de bacterias. Las bacterias son visto que recubre las paredes del conducto radicular en lo que parece ser una adhesión bacteriana (A, B). Nótese la ausencia de bacterias en la zona más apical. porción de la raíz en (B). Alto aumento en (C) muestra agregación de numerosos cocoides y filamentosos organismos. Tomado de Svensater y Bergenholtz, 2004.

Por último, el tercer tipo de estructura que representa el concepto actual de biopelícula está denominado como el modelo tulipán o champiñón, o también llamado, modelo de los canales de agua; el cual fue descrito usando microscopía confocal con el uso de marcadores fluorescentes. Este modelo revela una estructura común no sólida, en forma de champiñón o tulipán con el tallo más estrecho que su porción superior. Ésta estructura superior puede frecuentemente fusionarse, dejando galerías o canales a través de los cuales los fluidos ambientales pueden moverse, actuando como transporte de nutrientes, removiendo productos de desecho y actuando como conductos para moléculas mensajeras (Wimpenny y Colasanti 1997; Wimpenny *et al.*, 2000; Donlan, 2002).

Según la literatura, los microorganismos observados en la formación de un biofilm endodóntico generalmente son cocos, bacilos y filamentosos. Se han encontrado especies del género *Prevotella* muy frecuentemente debido a su capacidad de autoagregarse y coagregarse. Uno de los microorganismos fundamentales para el desarrollo de la biopelícula es *F. nucleatum* ya que presenta una gran capacidad de coagregación y resistencia a los irrigantes utilizados durante el tratamiento de conductos; se considera que *F. nucleatum* es la bacteria clave o “puente” para el desarrollo de la biopelícula (Saunders W y Saunders E, 1994). Este microorganismo Gram-negativo y anaerobio estricto, es un potencial patógeno en el

desarrollo de enfermedades endodónticas debido a que tiene la capacidad de producción sustancias irritantes que afectan el tejido produciendo cambios en el ambiente y permitiendo así que sus sucesores patógenos se establezcan formando la biopelícula; esta bacteria posee una gran capacidad para coagregarse y formar sinergismos con otras bacterias en infecciones mixtas sirviendo como puente microbiológico. De igual forma, se ha demostrado que las proteínas de membrana externa del *F. nucleatum* son de gran interés con respecto a la coagregación, la nutrición celular y la sensibilidad a diferentes antibióticos (Vivek R., Manzour S., Pandey A., 2009).

Otra de las bacterias más importantes que se han descrito en los modelos de biofilm endodóntico es el *Streptococcus intermedius*, bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva similar a *E. Faecalis*; se ha reportado que es una de las más importantes en la formación del biofilm endodóntico por su gran capacidad adhesiva, se aísla comúnmente en infecciones endodónticas y presenta resistencia a la remoción (Saunders W., Saunders E., 1994). Estudios han descrito a *Streptococcus oralis* como el microorganismo que mantiene el equilibrio u homeostasis dentro del biofilm, así como también se ha demostrado una disminución significativa en el crecimiento de *Actinomyces* cuando hay ausencia de *S. oralis*. Diferentes especies del género *Streptococcus* se encuentran en un alto porcentaje en infecciones endodónticas, estando presente en mayor frecuencia en las infecciones endodónticas primarias (Dufour D., Laung V., Levezque C., 2012).

Por su parte, *Actinomyces israelii* es considerado un microorganismo patógeno de los tejidos perirradiculares al ser difícil de eliminar con la instrumentación química y mecánica del conducto y por los pocos nutrientes y oxígeno que necesita para sobrevivir, esta bacteria se ha reportado frecuentemente en las infecciones endodónticas secundarias; aunque no se conoce con exactitud cómo llega este microorganismo al interior del conducto, algunos autores plantean la posibilidad de que esto suceda por perforaciones durante la instrumentación o presencia de conductos accesorios, estos sumado a los túbulos dentinales, le dan un refugio a este microorganismo por lo que se considera altamente patógeno y resistente a irrigantes (Jhajharia K., Parolia A., Vikram S., 2015).

Respecto al papel de *E. faecalis* en la formación del biofilm, se conoce que posee una alta resistencia a ser eliminada del conducto radicular incluso con instrumentación, irrigación y/o

con medicación (Saunders W., Saunders E., 1994). Estudios recientes como el de Kapil *et al.*, 2015 reportan que, en los mecanismos de formación de biopelículas intracanales, extra-radicales y periapicales, la arquitectura es heterogénea tanto en espacio como en tiempo, constantemente es cambiante debido a los procesos fisicoquímicas de las biopelículas, el microorganismo *E. faecalis* se adapta de acuerdo con las condiciones ambientales y nutrientes predominantes. Cuando *E. faecalis* posee gran cantidad de nutrientes produce estructuras de biopelículas típicas con agregados superficiales característicos de células bacterianas y canales de agua. El desarrollo de la biopelícula de *E. faecalis* en la dentina del conducto radicular implica tres etapas de la siguiente manera: La primera etapa es cuando las microcolonias se forman a medida que las células de *E. faecalis* se adhieren a la superficie de la dentina del conducto radicular, luego la disolución mediada por bacterias de la fracción mineral del sustrato de la dentina conduce a un aumento localizado en los iones de calcio y fosfato, causando la mineralización de la biopelícula de *E. faecalis* y termina debido a esta interacción de las bacterias y sus productos metabólicos en la dentina. Los autores sugieren la capacidad de este microorganismo para coexistir en una comunidad microbiana y contribuir a la infección endodóntica. Estas biopelículas apicales no pueden eliminarse solo por preparación biomecánica, ya que son resistentes a los agentes antimicrobianos (Kapil *et al.*, 2015).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 3.1 Descripción del problema

La caries dental ha sido considerada como una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial. En Colombia según el IV Estudio Nacional De Salud Bucal (ENSAB IV) realizado en el año 2014 por el Ministerio de Salud, del total de personas con dentición permanente describe una prevalencia del 55.82 % de casos de caries cavitacional. Esta distribución según los grupos de edad se presenta a los 12 años de edad, con una prevalencia de 37.45%, a los 18 años incrementa al 47.79%, en el grupo de 35 a 44 años se presenta el máximo valor con una prevalencia del 64.73% y desciende para el grupo de 65 a 79 años de edad con un 43.47% , lo cual indica alta prevalencia y riesgo en desarrollar infecciones endodónticas primarias en la población colombiana; ya que la caries dental es la principal causa de las infecciones endodónticas primarias que conlleva a tratamientos en donde el uso de irrigadores y medicamentos como el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  no siempre es efectivo en la desinfección del canal radicular esto sumado a la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares que por sus istmos, extensiones laterales, deltas apicales y canales accesorios, hacen más difícil el uso y la penetración de irrigantes convencionales, al impedir que estos logren llegar a cada espacio del conducto proporcionando así, un refugio para los microorganismos contra la acción de instrumentos, desinfectantes y medicamentos que podrían favorecer la reaparición de la infección endodóntica (Siqueira, 2007; Versiani *et al.*, 2012).

Aun con la evidencia epidemiológica que demuestra la elevada prevalencia de estos procesos infecciosos, el biofilm endodóntico no ha recibido la atención que merece sabiendo incluso que puede tener implicaciones clínicas importantes, especialmente desde el punto de vista del tratamiento (Svensäter, 2004). Por lo tanto, existe la necesidad de estandarizar un biofilm endodóntico multiespecie con el fin de ser usado en futuras investigaciones que permitan la validación de sustancias empleadas como irrigantes y medicamentos utilizados durante el tratamiento de conductos y así mejorar la tasa de éxito de los tratamientos endodónticos pudiendo evitar la aparición de infecciones endodónticas secundarias o persistentes y mejorando la calidad de salud oral de los pacientes en la población colombiana. Por esta razón en este proyecto surge la siguiente pregunta de investigación.

**3.2 Pregunta de Investigación** *¿Qué factores condicionan el crecimiento de diferentes especies orales en un biofilm multiespecie endodóntico in vitro?*

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Existe poco conocimiento sobre la manera en la que se adhieren las bacterias a las paredes del conducto radicular para formar la biopelícula y progresar hasta la destrucción de la pulpa (Svensäter y Bergenholtz, 2004). Sin embargo, se conoce que la capacidad de los microorganismos de formar comunidades depende de las condiciones ambientales y nutricionales (Kristich *et al.*, 2004). De igual manera, las bacterias desarrollan mecanismos que les permiten sobrevivir en un ambiente inhóspito, evadiendo la acción del sistema inmune y evitando la destrucción por parte de los fagocitos; el crecimiento en comunidad de las bacterias como método de supervivencia, les asegura sobrevivir a condiciones ambientales adversas (Siqueira *et al.*, 2001). El sinergismo bacteriano, aporta para la adaptación de las bacterias al medio en los conductos radiculares, algunos organismos pueden evitar los efectos de una preparación de conductos físico-química y la medicación intraconducto por medio de la adherencia a las superficies (Svensäter y Bergenholtz, 2004).

Se conoce que existe una alta prevalencia de fracasos de tratamiento endodónticos; teniendo en cuenta que una de las principales causas son los microorganismos que colonizan este sistema de conductos, especialmente *E. faecalis* debido a su capacidad de formar un biofilm calcificado sobre la dentina de los conductos radiculares que puede ser un factor que contribuya a su persistencia después del tratamiento endodóntico (Kishen A. y col.2006), es necesario la estandarización de un biofilm endodóntico multiespecies que permita entender las dinámicas de estas comunidades bacterianas en un sistema de conductos radiculares y que pueda ser usado en futuras investigaciones que permitan evaluar sustancias antimicrobianas, medicamentos y/o técnicas mecánicas que permitan mejorar la eficacia de los tratamientos endodónticos actuales y continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento intraconducto, pudiendo así, evitar la aparición de infecciones endodónticas secundarias o persistentes y mejorando la calidad de salud oral de los pacientes (Tabassum *et al.*, 2016).

## 5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

La formación de un modelo biofilm, sirve como un sustituto simplificado y practicable de la realidad clínica. Idealmente, el resultado de los estudios que emplean dichos sistemas modelo debería ser transferible a la clínica. Varios autores han utilizado microscopía óptica y/o electrónica para visualizar la infección endodóntica (Nair 1987; Molven *et al.*, 1991; Ricucci y Siqueira 2010). Estos estudios microscópicos han proporcionado información sobre la ubicación, distribución, morfología y organización de microorganismos dentro del conducto radicular infectado (Siqueira 2010).

Los primeros en corroborar la presencia de biopelículas intracanales utilizaron técnicas histobacteriológicas (secciones histológicas con tinción de bacterias) para analizar dientes o secciones de raíz con lesiones apicales obtenidas mediante cirugía apical o extracción. De igual manera, observaron biopelículas intrarradiculares en el segmento apical del 80% de los conductos radiculares no tratados. Estas biopelículas bacterianas generalmente eran gruesas y se componían de múltiples capas celulares, en donde describen Cocos, bastones y filamentos en la mayoría de los casos, sin embargo, un solo también describen una sola morfología como dominio de cada biopelícula (Ricucci y Siqueira, 2010).

Las biopelículas multiespecies, generalmente producen estructuras más gruesas que las poblaciones de una sola especie. Así mismo se ha reportado que, las biopelículas de múltiples especies también suelen ser más virulentas durante la infección y presentan mayor tolerancia a la respuesta inmune del huésped en comparación con las biopelículas de una sola especie (Pastar *et al.*, 2013).

En consecuencia, el uso de un modelo de biopelícula multiespecies generalmente requiere una amplia experimentación preliminar para evaluar el desarrollo y la composición de la biopelícula resultante. Como consecuencia de la creciente diversidad y complejidad de un sistema modelo multiespecies, la reproducibilidad del experimento generalmente disminuye. No solo establecer un modelo de biopelícula multiespecies se vuelve más complejo y exigente en términos de esfuerzos y recursos, sino que también su cuantificación basada en el cultivo se vuelve más engorrosa si se desconoce la porción de cada especie constituyente en la biopelícula (Swimberghe, 2018).

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo general:

Estandarizar un modelo de biofilm multiespecies endodóntico *In vitro* representativo de la infección endodóntica primaria.

### Objetivos específicos:

1. Formar biopelículas multiespecies endodónticas con *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
2. Evaluar el mejor tiempo de formación un biofilm multiespecies endodóntico con *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
3. Determinar viabilidad bacteriana y biomasa de biopelículas multiespecies endodónticas conformadas con *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

## 7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

**7.1 Tipo de estudio:** Experimental *In vitro*.

**7.2 Población y muestra Selección de bacterias:** Se seleccionaron las bacterias *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para el desarrollo del biofilm endodóntico multiespecies sobre láminas de vidrio.

**7.3 Condiciones de crecimiento bacteriano:** Cepas de *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012, *S. oralis* ATCC 35037, *E. faecalis* ATCC 29212 y *P. endodontalis* ATCC 35406 fueron descongeladas del cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, conservadas en caldo BHI (Brain Heart Infusion) con 10% de glicerol a -80°C; *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012 y *P. endodontalis* ATCC 35406 fueron cultivadas en agar Brucella suplementado con (0.3% de Bacto agar, 0.2% de extracto de levadura, 5% de sangre de cordero, 0.2% de sangre hemolizada, 0.0005% de hemina y 0.00005% menadiona) y fueron incubadas a 37°C durante 8 días en condiciones anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK); mientras que *S.oralis* ATCC 35037 fue incubada en agar sangre y *E. faecalis* ATCC 29212 en agar BHI a 37°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. Pasado el tiempo de incubación se verificó pureza de los cultivos y posteriormente se ajustaron inóculos de cada una de estas bacterias en caldo BHI. Los inóculos se ajustaron espectrofotométricamente a una concentración final aproximada de  $1 \times 10^8$  bacterias/mL (tabla 1). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

Bacterias	$\lambda$	Rango D.O
<i>A. israelii</i>	600 nm	0.98 - 1.02
<i>P. endodontalis</i>	620 nm	0.505 - 0.508
<i>F. nucleatum</i>	620 nm	1.088 - 1.180
<i>S. oralis</i>	580 nm	0.239 - 0.243
<i>E. faecalis</i>	580 nm	0.790 - 0.792

**Tabla 1. Longitud de Onda y rangos de densidad óptica ajustados para cada bacteria en el biofilm**

### **7.3.1 Formación de biofilm multiespecie endodóntico sobre láminas de vidrio**

Se formó una biopelícula multiespecie endodóntica similar a la reportada por Moon *et al.*, 2016 con modificaciones. Se preparó una suspensión mixta con las bacterias previamente ajustadas espectrofotométricamente y 1.5 mL de *E. faecalis*, 3 mL de *P. endodontalis*, 3 mL de *A. israelii*, 1.5 ml de *S. oralis* y 3 ml de *F. nucleatum*, se mezclaron en 11.760µL Caldo BHI y 240µL de solución de trabajo Hemina-Menadiona. Posteriormente, se colocaron láminas de vidrio de aproximadamente 11 x 11 milímetros en forma horizontal en placas de cultivo de 12 pozos, adicionando 400µL por pozo, de la suspensión bacteriana mixta. La incubación se realizó durante 3, 7 y 14 días en condiciones anaeróbicas a 37°C. Semanalmente se evaluó la presencia y viabilidad de cada microorganismo por plaqueo y recuento de UFC. Se evaluó la biomasa, viabilidad bacteriana y supervivencia de las especies a los 3, 7, y 14 días de formación de biofilm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

### **7.3.2 Evaluación de viabilidad y pureza de las biopelículas por plaques**

Para la confirmación de viabilidad bacteriana y pureza de las bacterias con las que se formó el biofilm, se transfirió la lámina en donde se formó el biofilm a un pozo nuevo, se agregaron 100µL de caldo VMGA I al pozo y se realizó disgregación mecánica del biofilm formado sobre las láminas de vidrio, posteriormente se tomaron 100µL de biofilm disgregado para realizar las diluciones seriadas 1:10 y plaques desde la dilución -1 hasta -6. Se sembraron las diluciones -4, -5 y -6 en agar brucella, agar sangre y agar BHI; el agar brucella se incubó por 4 días a 37°C en condiciones anaerobias y el agar sangre y BHI se incubó por 24 horas a 37°C en condiciones aerobias. Se realizó recuento de UFC que crecieron después de cada tiempo de formación de biofilm y se calculó el promedio del Log<sub>10</sub> de las UFC/mL ± DE.

### **7.3.3 Identificación microbiológica mediante MALDI-TOF MS**

Después de los plaques y verificación de pureza de las biopelículas en los diferentes medios de cultivo, se observó repetidamente el crecimiento de colonias betahemolíticas abundantes, patrón que no era compatible con las bacterias inicialmente puestas en el biofilm. Por lo anterior se realizó aislamiento de las colonias, cultivo individualizado, coloración de Gram, donde se observó la morfología cocos Gram positivos. Para tener certeza de que

microorganismo estaba creciendo en los biofilm se realizó identificación empleando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF MS por sus siglas en inglés “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry” para confirmar la identidad bacteriana.

Para esto se tomó una pequeña porción de una colonia bacteriana, la cual fue depositada sobre una placa metálica conductora propia del equipo MALDI Biotyper® Bruker Daltonics. Se adicionó 0.85µL de ácido fórmico al 100%, una vez se secó el ácido, se adicionó 0.85µL de una solución saturada denominada matriz de la marca SIGMA, el cual después de la cristalización de esta con el material microbiano, se introdujo la placa de metal en el espectrómetro de masas MALDI Biotyper® Bruker Daltonics perteneciente a la Pontificia Universidad Javeriana y se sometió a pulsos de láser UV. La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, desencadenaron una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo. Las moléculas ionizadas fueron aceleradas a través de un campo electrostático y fueron expulsadas a través de un tubo de vuelo de metal sometido a vacío hasta que alcanzaron un detector, de esta manera se generó información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga ( $m/z$ ), llamada también huella digital de la masa de los péptidos. Una vez generado el perfil espectral del microorganismo de prueba, se comparó automáticamente mediante el software de control flexControl 3.0; Bruker Daltonics, Alemania, el cual permitió la identificación del microorganismo *E. faecalis* con score por encima de 2, lo que significa que se identificó género y especie bacteriana con un alto nivel de confianza.

#### **7.3.4 Evaluación de la biomasa del biofilm mediante la técnica de cristal violeta**

Se evaluó la biomasa del biofilm formado mediante el método de cristal violeta como lo describe Haney *et al.*, con modificaciones. Cada biofilm formado sobre las láminas de vidrio fue transferido a un pozo nuevo y estéril. Se adiciono 1 mL de cristal violeta al 0.1% para teñir la biomasa adherida al vidrio, posteriormente cada espécimen fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente y pasado este tiempo se retiró cuidadosamente el colorante, se realizó un lavado cuidadoso con PBS 1X para remover exceso de colorante no adherido y el colorante adherido a la biomasa fue solubilizado adicionando a cada pozo 200 µL de etanol al 70%. 150 µL del volumen fue transferido a placas de 96 pozos y se leyó la absorbancia espectrofotométricamente en el fotofluorómetro Infinite® 200 PRO Tecan, a una longitud de

onda ( $\lambda$ ) de 595 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. Todas las lecturas fueron comparadas con un montaje control sin biofilm para determinar la biomasa total formada.

### **7.3.5 Evaluación de la viabilidad bacteriana mediante epifluorescencia LIVE/DEAD™ BacLight™**

Se evaluó la viabilidad bacteriana usando el kit de viabilidad LIVE/DEAD™ BacLight™ (SYTO 9 a 3.34 mM y yoduro de propidio a 20 mM), para determinar el porcentaje de viabilidad de las biopelículas después de cada uno de los tiempos de formación como lo reportan Castillo *et al.*, 2015.

Se utilizaron colorantes, SYTO 9 para diferenciar las bacterias con membrana intacta, vivas (fluorescencia verde) de las bacterias con membrana alterada, muertas con yoduro de propidio (fluorescencia roja). Las imágenes se observaron en un microscopio de fluorescencia (Axio-Imager M2; Zeiss, Jena, Alemania) y fueron capturadas con el sistema Apotome 2.0 en objetivo 100X. Se realizaron reconstrucciones utilizando el software Zen 3.3 pro con una configuración en Z-Stack de 10 slices, rango 1.800 $\mu$ m, intervalo de 0.200  $\mu$ m para todas las imágenes. El porcentaje de viabilidad se determinó por el número de píxeles para bacterias vivas y muertas utilizando el software Zen 3.3 pro y los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad como lo describe (Laverde y Alfonso 2019). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado para cada tiempo de evaluación en experimentos independientes.

### **7.4 Hipótesis de estudio**

**Hipótesis nula:** El biofilm multiespecie endodóntico se forma con una menor estabilidad y viabilidad a los 14 días de incubación con las especies de *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012, *S. oralis* ATCC 35037, *P. endodontalis* ATCC 35406 y *E. faecalis* ATCC 29212 en comparación con el biofilm formado a los 7 días evaluados.

**Hipótesis alterna:** El biofilm multiespecie endodóntico se forma con una mayor estabilidad y viabilidad a los 14 días de incubación con las especies de *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. israelii* ATCC 12012, *S. oralis* ATCC 35037, *P. endodontalis* ATCC 35406 y *E. faecalis* ATCC 29212 en comparación con el biofilm formado a los 7 días evaluados.

### **7.5 Plan de tabulación y análisis.**

Para analizar la viabilidad bacteriana y biomasa se compararon los cambios en la viabilidad y la biomasa 3, 7 y 14 días con una prueba pareada paramétrica (ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS) o no paramétrica (PRUEBA DE FRIEDMAN) de acuerdo con el tipo de distribución de los datos. Se utilizó el paquete estadístico STATA versión 11 para Windows, todos los análisis se harán con un nivel de significancia del 5%.

## **8. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este proyecto está enmarcado dentro un macroproyecto financiado por la vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque bajo el PCI 2018-10160 y en el marco de este proyecto cuenta con aval ético del comité institucional de ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque. El proyecto de investigación no realiza experimentos en humanos, animales, ni organismos genéticamente modificados, se acoge a las disposiciones vigentes para investigación básica *in vitro*.

### **8. 1 Sustento legal**

Las bacterias que se usarán en el estudio representan un riesgo mínimo para la salud humana. Todos los experimentos serán realizados siguiendo las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, Resolución N° 0008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Recuentos bacterianos ajustados para el biofilm

Las bacterias empleadas en el biofilm fueron ajustadas a una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  bacterias/mL. Se obtuvieron recuentos diferentes para cada bacteria (tabla 2). *P. endodontalis* fue utilizada a una concentración de  $8.92 \pm 0.19$  en Log 10, *A. isrraelli* fue ajustada a una concentración de  $8.801 \pm 0.05$  UFC en Log 10, *E. faecalis* ATCC 29212 fue utilizada a una concentración de  $8.742 \pm 0.03$  en Log 10 y *S. oralis* ATCC 35037 fue utilizada a una concentración de  $7.661 \pm 0.10$ . Uno de los microorganismos que también se ajustó para incluir al biofilm fue *F. nucleatum* ATCC 25586 sin embargo no alcanzó la densidad óptica requerida.

**Tabla 2. Promedios de recuentos de inóculos bacterianos expresados en Log 10.**

Bacteria	Promedio de UFC en Log10 $\pm$ (DE)	CV
<i>P. endodontalis</i> ATCC 35406	$8.926 \pm (0.19)$	2.13%
<i>A. isrraelli</i> ATCC 12012	$8.801 \pm (0.05)$	0.66%
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$8.742 \pm (0.03)$	0.43%
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	$7.661 \pm (0.10)$	1.32%

### 9.2 Viabilidad bacteriana del biofilm a los 3, 7 y 14 días confirmada por plaqueo.

Se verificó la viabilidad de los microorganismos después de 3, 7 y 14 días de crecimiento en biopelícula mediante plaqueo en agar BHI, agar sangre y agar brucella de los cuales, se confirmó crecimiento de UFC de los microorganismos inicialmente inoculados a la biopelícula y correspondientes a: *A. isrraelli*, *F. nucleatum*, *P. endodontalis*, *S. oralis* y *E. faecalis*, en donde también se pudo evidenciar que se obtuvo una biopelícula pura, es decir, que los microorganismos detectados fueron los mismos que se sembraron en el inicio de la formación de la biopelícula y se encontraban viables (tabla 3).

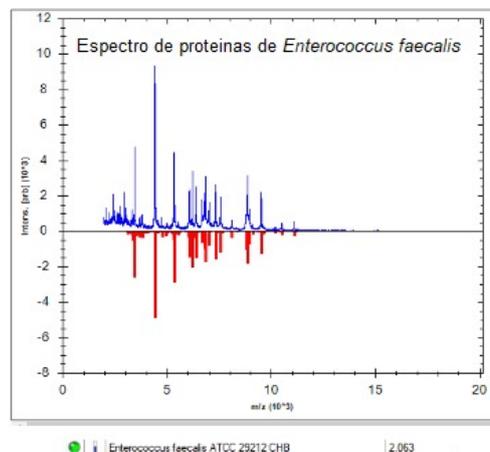
**Tabla 3. Recuento de biofilm a los 3, 7 y 14 días en Unidad formadora de colonias**

Bacterias	Media de UFC en Log10 ± (DE) 3 DÍAS de formación de biofilm	Media de UFC en Log10 ± (DE) 7 DÍAS de formación de biofilm	Media de UFC en Log10 ± (DE) 14 DÍAS de formación de biofilm
<i>A. isrraelli</i> ATCC 12012	0 ± (0)	2.2 ± (3.8)	0 ± (0)
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	4.6 ± (4.0)	2.41±(4.1)	2.1 ± (3.7)
<i>F. nucleatum</i> ATCC 2558	0 ± (0)	0 ± (0)	0 ± (0)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5 ± (0.7)	7.3 ± (0.1)	7.5 ± (0.3)
<i>P. endodontalis</i> ATCC 35406	0 ± (0)	0 ± (0)	2.4 ± (4.2)

En cuanto a los resultados observados del crecimiento bacteriano en el biofilm, se pudo evidenciar crecimiento a los 3, 7 y 14 días de *S. oralis* y *E. faecalis*, mientras que *A. isrraelli* solo creció a los 7 días de formación de biofilm y *P. endodontalis*, solo evidenció crecimiento en el biofilm formado a los 14 días. Por otra parte, *F. nucleatum* no creció en ningún tiempo de incubación.

### 9.3 Identificación mediante MALDI-TOF MS de *E. faecalis*

Se obtuvo por medio del análisis MALDI-TOF MS el siguiente espectro el cual fue compatible con *E. faecalis* ATCC 29212 con un resultado superior de 2.063



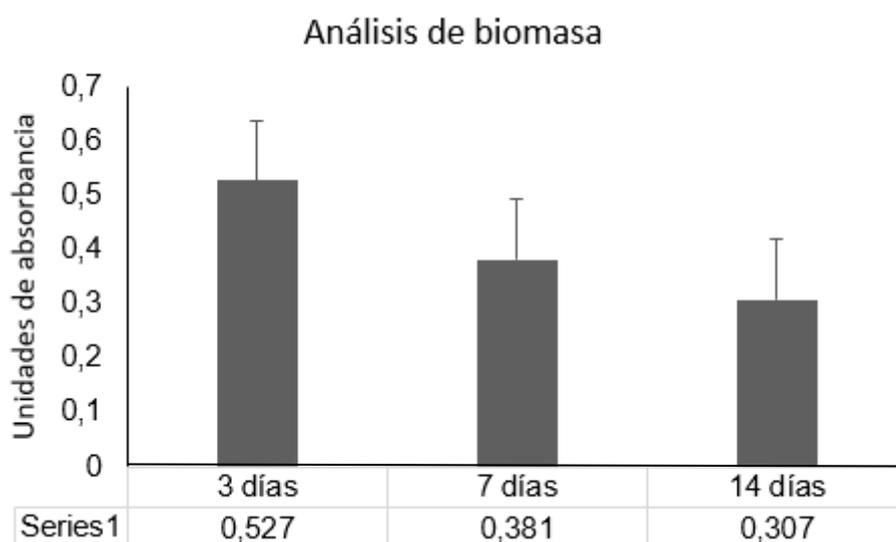
**Figura 4. Identificación mediante MALDI-TOF MS de *E. faecalis*.**

El perfil del espectro de masas se registró en un modo de iones positivos lineales con parámetros del instrumento optimizados para el rango de  $m/z$  2.000 a 20.000 bajo software de control (flexControl 3.0; Bruker Daltonics, Alemania). Los parámetros del espectrómetro de

adquisición se utilizaron mediante el método MBT.FC.par preprogramado: los voltajes de las fuentes de iones 1 y 2 se establecieron en 19,4 kV y 18,07 kV, respectivamente. El voltaje de la lente se fijó en 7,0 kV. La calibración de masa externa se realizó con una mezcla de proteínas contenidas en el estándar de prueba bacteriano (BTS, Bruker Daltonics) con una tolerancia de masa promedio de aproximadamente 25 ppm.

#### 9.4 Análisis de la biomasa del biofilm a los 3, 7 y 14 día de formación

Para la determinación de la biomasa se llevaron a cabo mediciones directas de absorbancia mediante la técnica de cristal violeta. Asimismo, se midió la biomasa mediante análisis de imagen de las preparaciones de estas muestras. Los resultados se presentan en la figura 5. Cuando se analizó la biomasa de las biopelículas en los diferentes tiempos de formación la tendencia observada es que a medida que incrementa los tiempos de formación del biofilm la biomasa disminuye.

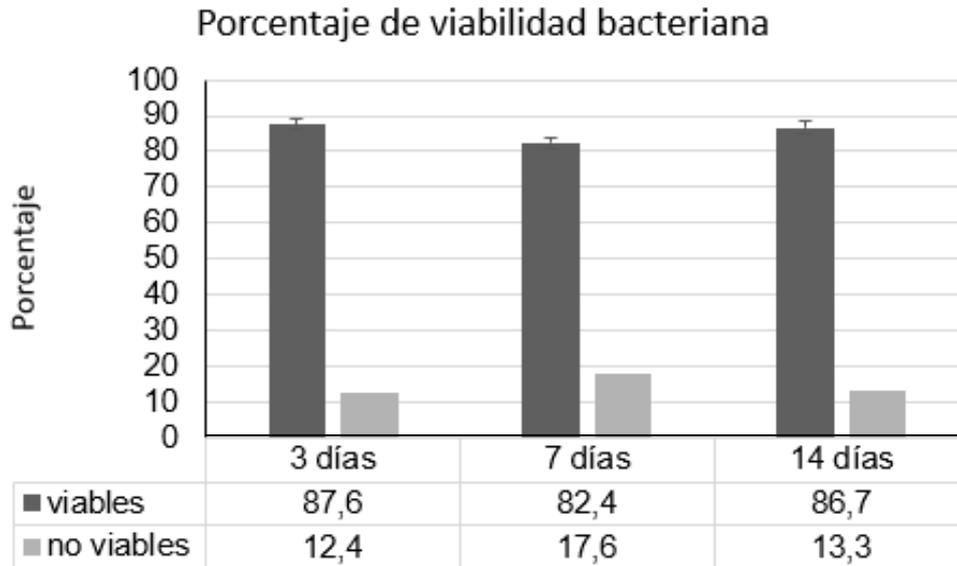


**Figura 5.** Análisis de biomasa en condiciones de crecimiento a los 3, 7 y 14 días de formación.

#### 9.5 Porcentajes de viabilidad del biofilm analizados por epifluorescencia

Se analizó el porcentaje de viabilidad bacteriana de las biopelículas a los 3, 7 y 14 días de formación, encontrando que, el biofilm formado sobre láminas de vidrio a los 3 días tiene una proporción de células vivas del 87.6% comparado con la de células muertas del 12.4%. A los 7 días se observó una mayor proporción de células vivas (82.4%) que células muertas (17.6%) y

a los 14 días una proporción de células vivas del (87.6%) en comparación con las células muerta (13.3%) lo cual sugiere que a los 3 días de formación de biofilm se obtuvo mayor supervivencia bacteriana como se muestra en la figura 6.

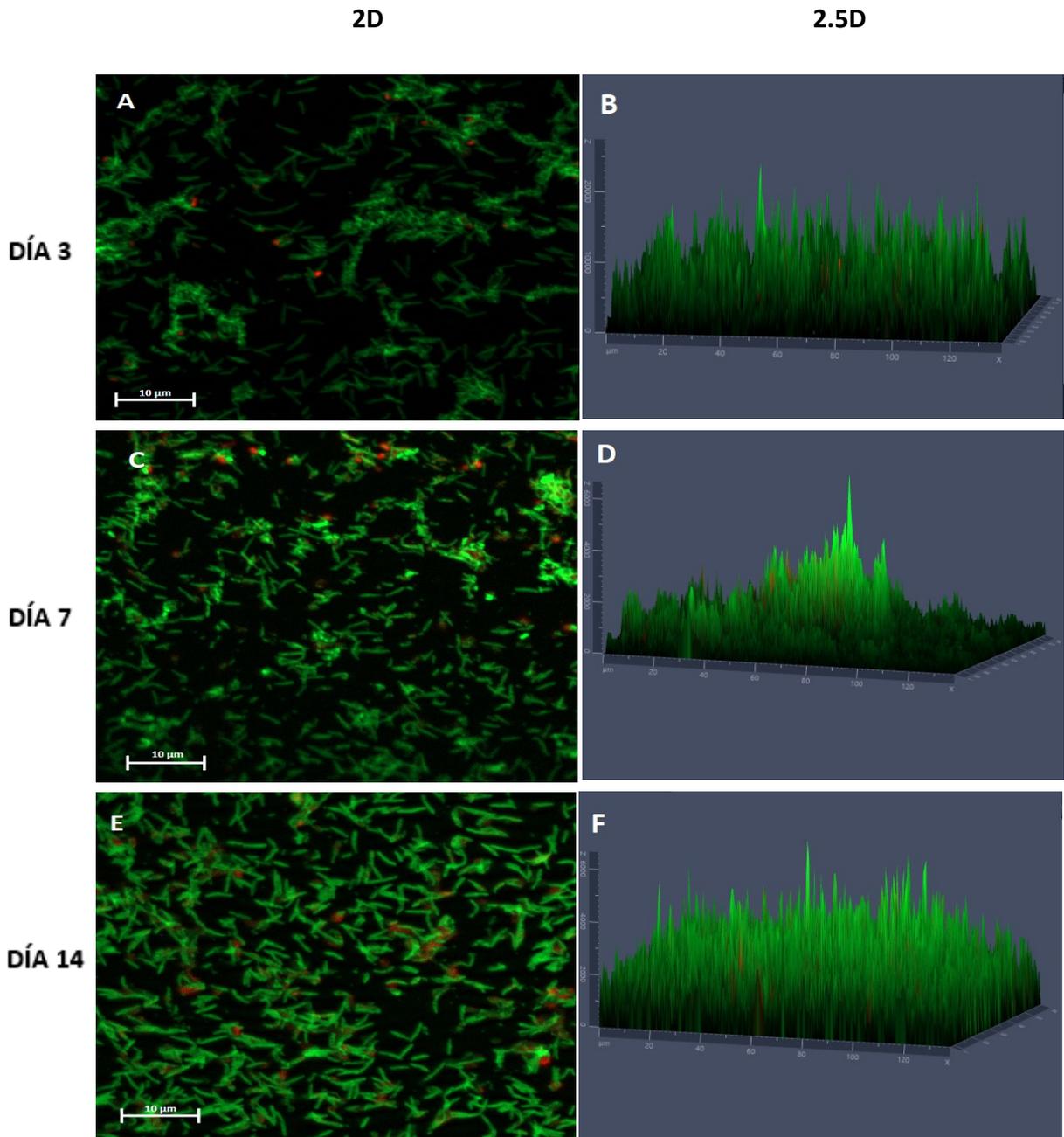


**Figura 6.** Porcentaje de viabilidad bacteriana de biofilm sobre láminas de vidrio a los 3, 7 y 14 días.

### 9.6 Análisis de viabilidad y microscopía de fluorescencia en los diferentes tiempos de formación de biofilm

En las imágenes 2D y 2,5D de la figura 7, se observan conglomerados más brillantes correspondientes a cúmulos microbianos típicos de biopelículas donde predomina en canal verde, lo cual indica que la mayoría de las bacterias están vivas como lo refleja los porcentajes de viabilidad que se han mostrado anteriormente, además de no presentar discrepancias significativas a los 3, 7 y 14 días de formación de biofilm. Adicionalmente, al analizar la viabilidad junto con la microscopía de fluorescencia en los diferentes tiempos de formación de biofilm, se observa a los 3 días (imagen A y B) un menor porcentaje de áreas de ocupación en el campo, y una colonización microbiana que no es homogénea con espacios libres, mientras que a medida que va aumentando el tiempo la ocupación por el grupo de microorganismos es mayor y más homogénea como se observa a los 14 días (imagen E y F) en donde la cantidad microbiana tapiza la superficie y lo hace más viable.

## Análisis de viabilidad y microscopía en diferente tiempo de formación del biofilm



**Figura 7.** Análisis de viabilidad y microscopía de fluorescencia en los diferentes tiempos de formación de biofilm.

## 10. DISCUSIÓN

En este estudio se desarrollaron biopelículas sobre láminas de vidrio siguiendo las recomendaciones de Moon *et al.*, 2016 con modificaciones. Se ha reportado que sobre las paredes de conductos radiculares generalmente hay crecimiento de microcolonias bacterianas conformadas por cocos, bacilos, filamentos y espiroquetas (Zehnder *et al.*, 2002).

En este estudio se conformaron biopelículas mixtas a los 3, 7 y 14 días con bacterias que han sido ampliamente reportadas en modelos de biofilm endodóntico como *Actinomyces israelii*, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Enterococcus faecalis*. Se conoce que la infección endodóntica tiene una diversidad microbiana importante y las características de las biopelículas no pueden ser observadas y analizadas en estudios con una sola especie; estudios han reportado que dentro de los microorganismos involucrados en la formación del biofilm, se encuentran bacterias del género *Streptococcus*, *Prevotella*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Actinomyces* y *Campylobacter* (Love, 2002).

Bacterias aerobias o anaerobias facultativas como *S. oralis* y *E. faecalis*, muestran un alto crecimiento en estas biopelículas, encontrándose en los 3 tiempos de formación del biofilm. Se ha reportado que *S. oralis* actúa como microorganismo oportunista y puede facilitar la formación de biopelículas promoviendo la colonización y supervivencia de ambas especies, por su parte, *E. faecalis* presenta una amplia variedad de factores de virulencia como la producción extracelular de gelatinasa obteniendo como resultado su habilidad para la formación de biopelículas y su capacidad de sobrevivir sin el soporte de otras bacterias (Love, 2001). Este microorganismo tiene la habilidad de crecer y predominar en un ambiente bajo en nutrientes y la capacidad de co-agregarse con una variedad de *Streptococcus* facilitando la formación de la biopelícula (Waltimo *et al.*, 2004).

El crecimiento de *S. oralis* y *E. faecalis* en todos los tiempos de formación se atribuye a que son microorganismos nutricionalmente menos exigentes en comparación con los anaerobios, siendo estos últimos más exigentes y crecen a partir de los 7 días de formación del biofilm, sin embargo, este patrón es variable entre los mismos microorganismos anaerobios ya que mientras que *A. israelii* creció a los 7 días, a los 14 no se evidenció su crecimiento, esto puede relacionarse a una competencia nutricional con *E. faecalis*. En un estudio desarrollado por

Thurnheer y Belibasakis en 2015, se reportó que *E. faecalis* tiene un antagonismo importante con bacterias del biofilm, principalmente con *Actinomyces* mostrando una reducción significativa en el crecimiento de este microorganismo cuando *E. faecalis* es agregado a una biopelícula ya formada (Thurnheer y Belibasakis, 2015). Esta podría ser una de las razones por las que *A. isrraelli* creció a los 7 días de formación del biofilm pero no logró sobrevivir hasta los 14 días; de igual manera, la escasez de nutrientes en el biofilm que incrementa conforme avanza el tiempo, podría ser otra causa por la que no sólo se evidenció en crecimiento de *A. isarraelli* en el biofilm de 7 días ya que al ser una bacteria anaerobia tiene unos requerimientos nutricionales más específicos que *E. faecalis* que soporta condiciones de restricción nutricional altas y aún así logra sobrevivir y desarrollarse. Adicionalmente, un estudio realizado por Chávez de Paz *et al.*, en 2007 mostró que *E. faecalis* tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de otras especies en biopelículas multiespecies (Chávez de Paz *et al.*, 2007) y en nuestro estudio, *E. faecalis* parece haber suprimido el crecimiento de otras especies dentro de la biopelícula formada sobre láminas de vidrio.

En cuanto al crecimiento de *P. endodontalis*, solo se evidenció en el tiempo de formación de 14 días, coincidiendo con otros modelos de biofilm en donde se reporta que especies anaerobias más exigentes como lo es *P. endodontalis* requirieron un mayor período de incubación (aproximadamente 10 días) para el desarrollo de la biopelícula (Sena *et al.*, 2006).

En los cultivos se observaron algunas colonias que exhibían un fenotipo diferente al de los microorganismos que inicialmente se habían colocado y sospechando de una contaminación, se realizó la técnica de MALDI-TOF MS para averiguar la identidad de este microorganismo y se encontró que era *E. faecalis* con el 100% de identidad; este microorganismo exhibe características hemolíticas gracias a que expresa hemolisinas actuando como bactericida contra bacterias grampositivas y gelatinasas que provee de nutrientes a la bacteria degradando tejido y ayudando en la formación de biopelícula

Cuando se analizó el crecimiento de los microorganismos que se emplearon para la formación de la biopelícula se pudo observar que con *F. nucleatum* no se alcanzó una concentración bacteriana suficiente que permitiera competir con las otras bacterias y asegurar su crecimiento en el biofilm; esto logra mostrar que la concentración de las bacterias en el biofilm es un aspecto clave para que los microorganismos prosperen, logren competir entre ellos y puedan mantenerse (Padilla *et al.*, 2012)

Adicionalmente, se analizó la variación de la biomasa de las biopelículas dependiendo de los tiempos de formación y la tendencia observada es que a medida que incrementan los tiempos de formación del biofilm, la biomasa disminuye. La composición y estructura de la matriz extracelular producida por estos microorganismos puede cambiar a medida que avanza el tiempo dependiendo de las adaptaciones bacterianas y condiciones del medio ambiente, esta matriz extracelular forma estructuras similares a champiñones entre las que se observan canales y los microorganismos van a producir cantidades diferentes de polisacáridos extracelulares con la edad de la biopelícula, estos polisacáridos van proveen una reserva de sustrato para las bacterias por lo que la disponibilidad de nutrientes va a variar y como consecuencia de esto se va a observar un cambio en la composición de la biopelícula (Tolker, 2015).

Cuando se analizó la viabilidad bacteriana en las biopelículas formadas se encontró que la viabilidad es similar en los 3 tiempos de formación y lo que cambia es la disposición de las bacterias al aumentar el tiempo, mientras que al principio empiezan como agregados separados, con el paso de los días, se observan conglomerados más grandes y brillantes correspondientes a acúmulos bacterianos típicos de biopelículas y al final se observa un área de ocupación mayor y más pareja formando tapizados sobre la lámina de vidrio; esto ratifica que la biomasa es inversamente proporcional al paso del tiempo.

Por otra parte, cuando se observan los resultados de microscopias de epifluorescencia, se observa que predomina el canal verde indicando que la mayoría de las bacterias están vivas lo que se corrobora con los porcentajes de viabilidad.

## **11. RECOMENDACIONES**

Dentro de las recomendaciones que se podrían realizar al final de este estudio, se sugiere aumentar la concentración de *F. nucleatum* para poder garantizar una concentración que le permita el crecimiento dentro del biofilm multiespecies; así mismo, sería conveniente extrapolar estos datos a un modelo con dentina humana para confirmar si el comportamiento en la formación y estructura del biofilm se mantiene, debido a que es la condición más apropiada a la realidad clínica de la infección endodóntica primaria.

## **12. CONCLUSIONES**

A pesar de que se han realizado modelos de biofilm endodóntico monoespecies, se conoce que la infección endodóntica primaria se da principalmente por la colonización de una diversidad de microorganismos por lo que es importante continuar con el estudio de estas biopelículas formadas dentro del sistema de conductos. En este estudio se formaron biopelículas multiespecies endodónticas con microorganismos aerobios y anaerobios sobre láminas de vidrio con un porcentaje de viabilidad alto y encontrando una reducción de la biomasa del biofilm conforme aumentan los días de formación.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res* 1982 Feb; 61:435-438.
- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplementum* 2013; 121: 1–51.
- Cardona J, Fernández R. Anatomía radicular, una mirada desde la micro-cirugía endodóntica: Revisión. *CES Odontología* 2015, 28(2), 70-99.
- Carrotte, P. Endodontics: Part 4 Morphology of the root canal system. *Br Dent J* 2004; 197, 379–383.
- Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderón JL, Lafaurie GI. Viability and Effects on Bacterial Proteins by Oral Rinses with Hypochlorous Acid as Active Ingredient. *Braz Dent J.* 2015; 2 6(5):519-24.
- Chavez de Paz, L.E. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007, 33, 652–662, doi:10.1016/j.joen.2006.11.004.
- Choi Y-S, Kimb C, Moon J-H, Lee –Y. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *BMJ* 2018 Jan; 49: 184-188.
- Clegg M, Vertucci F, Walker C, Belanger M, Britto L. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilm in vitro. *J Endod*, 2006, 32(5):434-7.
- Donlan R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002, 8(9):881-90.
- Dufour D, Laung V, Levezque C. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics* 2012; Vol 22, pp. 2-16.
- Estrela C, Bueno M, Couto G, Rabelo L.E, Alencar A.H, et al. Study of Root Canal Anatomy in Human Permanent Teeth in A Subpopulation of Brazil's Center Region Using Cone-Beam Computed Tomography - Part 1. *Brazilian Dental Journal.* 2015; 26(5), 530-536.
- Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research*; 1982.
- Felitti R. Propóleo en odontología. Usos y aplicaciones. *Actas odontológicas.* Jul 2014; 21(1): 30-7.

Ferreira F, Ferreira A, Gomes B, Souza-Filho F. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endodon J*, 2004; 37,61-9.

Fouad A, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf J. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(9):3223-31.

Gomes B, Martinho F. Comparison of Endotoxin Levels Found in Primary and Secondary Endodontic Infections. *J Endod*. 2012 August; 38(8): p. 1082-1086.

Gomes Brenda Paula Figueiredo de Almeida, Herrera Daniel Rodrigo. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz. oral res*. 2018; 32( Suppl 1 ).

Goldberg M, Hirata A. *The Dental Pulp : Composition , Properties and Functions*. Corpus. 2017; (27): 4-15.

Granda M.G, Caballero G.S, Agurto H.A. Estudio de la anatomía de raíces y conductos radiculares en segundas molares permanentes mandibulares, mediante tomografía computarizada de haz cónico en población peruana. *Odontología Vital*. 2017 June;( 26 ): 5-12.

Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules*. 2018 May 21;8(2):29

Jefferson K. What drives bacteria to produce a biofilm?. *Microbiology letters*; 2004, (236):163-73.

Jhajharia K, Parolia A, Vikram SK. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2015; 5(1). 1-12.

Kotloor J, Albuquerque D, Velmurugan N, Kuruvilla J. Root anatomy and root canal configuration of human permanent mandibular premolars: a systematic review. *Anat Res Int*. 2013 ;2013:254250.

Kristich C, Cvitkovitch D, Dunny G. Esp-Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2004, 186:154-63.

Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Silva B, Hamdan J, Nicoli J, Carvalho M, Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(2):100-5.

Lasa I., Pozo J. L. del, Penadés J. R., Leiva J.. Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra*. 2005 Ago; 28( 2 ): 163-175.

Liu X, Gao M, Ruan J, Lu Q. Root Canal Anatomy of Maxillary First Premolar by Microscopic Computed Tomography in a Chinese Adolescent Subpopulation. *Biomed Res Int*. 2019 Nov 16;2019:4327046.

Love R. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endodontics topics*, 2004, 9:52-65.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(2):171-183.

Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul; 34:399-405.

Mohammadi A, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: An update review. *Biomed J*. 2013 Mar-Apr;36(2):59-70.

Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1991 Oct;7(5):226-9.

Moon JH, Ys, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol*. 2016 Apr; 54 (4): 322-9.

Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod*. 1987 Jan;13(1):29-39.

Orstavik D. Root canal disinfection: a review of concepts and recent developments. *Aust Endod J* 2003 Aug; 29: 70-74

Padilla C, Núñez M, Padilla A, Lobos O. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Revista chilena de infectología*; 2012, 29(1), 55-61.

Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, Stojadinovic O et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One*. 2013;8(2):e56846.

Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 2001 Apr;34(3):221-30.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277-88.

Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J.* 2019 May;52(5):604-628.

Saunders W, Saunders E. Coronal leakage as a cause of failure in root canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1994;10(3):105-8.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* 2008 May;34(5):541-5.

Schaudinn C, Jaramillo D, Freire MO, Sedghizadeh PP, Nguyen A, Webster P et al. Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth. *Int Endod J.* 2013 Oct;46(10):930-7.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol.* 1995 Feb;11(1):6-9.

Sena, NT, Gomes BP, Vianna M.E, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International endodontic journal*; 2006, 39(11), 878-885.

Siqueira JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspective. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2002, 94(3), 281-293.

Siqueira JF. Microbiology and treatment of endodontic infections. In: Hargreaves KM, Cohen S. *Pathways of the pulp*. Tenth edition. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier. 2011. p. 559 – 600.

Siqueira J, Rocas I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2- Redefining the Endodontic Microbiota. *J Endod.* 2005; p. 488-498

Siqueira JF., Rocas I., Oliveira J., & Santos K. Molecular Detection of Black-Pigmented Bacteria in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics*, 2001 27(9), 563–566.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10.

Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):800-5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):181-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93-8.

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, 2004.p.27-36.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar;10(1):144-147.

Tang G, Samaranayake L, Yip H, Chu F, Tsang P, Cheung B. Direct detection of *Actinomyces* spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. *J Dent.* 2003;31(8):559-68

Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. *Virulence.* 2015;6(3):258-64.

Tolker-Nielsen T. Biofilm development. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(2): 1-12.

Versiani MA, Pécora JD, de Sousa-Neto MD. Root and root canal morphology of four-rooted maxillary second molars: a micro-computed tomography study. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):977-82.

Vivek, R; Manzour, S; Pandey, A. Bacteriology of Infected Deciduous Root Canal. *People's Journal of Scientific Research.* 2009; 2(2): 45-48.

Waltimo T, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infection. *Endodontic Topics*, 2004; 9:66-78.

Wimpenny J, Colasanti R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997.p.1-16.

Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2000 Dec;24(5):661-71.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral surg Oral med Oral Pathol* 2002; 94:756-62