

### Título en español:

Prevalencia de microorganismos identificados con técnicas moleculares en infección secundaria en el tratamiento de endodoncia. Una revisión de la literatura.

### Título en inglés:

Prevalence of microorganisms identified with molecular techniques in secondary infection in endodontic treatment. A review of the literature.

### Autores:

- Verónica Daniela Hurtado Narváez
  - Odontóloga, Universidad Católica de Cuenca
  - Residente segundo año posgrado endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana
  - [veronicahurtadon@javeriana.edu.co](mailto:veronicahurtadon@javeriana.edu.co)
  
- Adriana Rodríguez
  - Bacterióloga, Magister en Microbiología
  - Profesora Asociada, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
  - [aciodar@gmail.com](mailto:aciodar@gmail.com)
  
- Catalina Méndez de la Espriella
  - Odontóloga Colegio Odontológico Colombiano.
  - Especialista en Endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana
  - Coordinador Posgrado de Endodoncia, Pontificia Universidad Javeriana.
  - [catalina.mendez@javeriana.edu.co](mailto:catalina.mendez@javeriana.edu.co)
  
- Hugo Diez Ortega
  - Bacteriólogo, Magister en Microbiología, Doctorado en Ciencias Biológicas.
  - Docente de la facultad de Ciencias Básicas
  - [hugo.diez@javeriana.edu.co](mailto:hugo.diez@javeriana.edu.co)

**Resumen: Objetivo:** Describir los microorganismos más frecuentes identificados con técnicas moleculares en muestras de lesiones secundarias en el tratamiento de endodoncia. **Método:** La búsqueda de artículos fue realizada por un investigador en bases de datos Pubmed, Scopus, Google Scholar, Scielo y Redalyc, incluyendo estudios desde el año 2000 hasta el 2020. Precisando los términos que permite determinar el objetivo de la revisión además de las palabras claves: Microbiology, biofilm, microbiota, endodontic treatment failure, secondary endodontic treatment, molecular techniques. Filtros como los operadores booleanos AND y OR, limitando el campo de búsqueda de estas palabras en el título y en el resumen. **Resultados:** 30 artículos incluidos en la revisión con el diagnóstico de periodontitis apical, con diferentes técnicas moleculares, los tipos de microorganismos aislados con mayor frecuencia y su cuantificación. **Conclusiones:** La PCR convencional es la técnica de mayor uso para detectar microorganismos en las infecciones endodónticas secundarias, por su alta sensibilidad y especificidad. *E. faecalis* fue el microorganismo más comúnmente aislado en las infecciones endodónticas secundarias. Se necesitan más estudios debido a que los artículos se centran en caracterizar los microorganismos más comunes y no en los de prevalencias más bajas. Además, se observa que la cuantificación de los

microorganismos varía por las diferentes técnicas moleculares que se emplean en cada estudio. **Palabras claves:** Microbiología, microbiota, lesión secundaria, técnicas moleculares.

**ABSTRACT Objective:** To characterize the microorganisms with the highest pathogenicity from samples, obtained through different molecular techniques, after failed endodontic procedures. **Methodology:** The search for articles was done by a researcher using the Pubmed, Scopus, Google Scholar, Scielo and Redalyc databases, including studies from the years 2000 to 2020. Specifying the terms that enable determining the objective of the review in addition to the keywords: microbiology, biofilm, microbiota, endodontic treatment failure, secondary endodontic treatment, molecular techniques. Filters like the boolean operators AND and OR, limiting the search field to these words in the title and the abstract. **Results:** 30 articles included in the review with the diagnosis of apical periodontitis, with different molecular techniques, the isolated microorganisms with the highest frequency and their quantification. **Conclusions:** Conventional PCR is the most widely used technique to detect microorganisms in secondary endodontic infections, because of their high sensitivity and specificity. The *E. faecalis* was the most isolated microorganism in secondary endodontic infections. More studies are needed since the articles focus on characterizing the most common microorganisms and not those that are present with lower prevalence. Furthermore, it is observed that the quantification of the microorganisms varies by the different molecular techniques that are used in each study. **Keyword:** Microbiology, biofilm, microbiota, secondary lesión, molecular techniques.

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de endodoncia es un procedimiento con una tasa de éxito entre el 82,8% y el 97,3% en dientes sin periodontitis apical, mientras que el diagnóstico de periodontitis apical varía entre el 75,6% y el 87,77%; es esencial que en el tratamiento elimine todo el tejido pulpar sea vital o necrótico, los restos de dentina infectada y microorganismos viables del sistema de conductos radiculares. La literatura reporta que la razón principal del fracaso del tratamiento de endodoncia, es la persistencia de microorganismos posterior a éste o la recontaminación del sistema del conducto debido a un sellado inadecuado (1–3).

Estudios que investigan la microbiota intrarradicular asociada al fracaso endodóntico, reportan microorganismos entre el 35% -100% de los casos(4). Otros estudios demuestran la persistencia bacteriana entre un 40% a un 60% en el sistema del conducto radicular posterior al tratamiento primario.(5)

Problemas como el inadecuado selle apical, permiten que los fluidos tisulares ricos en glicoproteínas se filtren hacia el conducto radicular, proporcionando un sustrato a los microorganismos restantes, que pueden proliferar y alcanzar un número suficiente para generar o perpetuar una lesión perirradicular.(1)

Por otra parte, situaciones como la falta de un sellado coronal, una inadecuada adaptación de materiales de restauración (temporales o permanentes), la fractura o pérdida de la restauración, la fractura de la estructura dental y la presencia de caries secundarias, pueden exponer el material de obturación radicular permitiendo así la contaminación de este y la posible aparición de una lesión periapical. (1)

Prada et al. en 2019 (1) en su artículo publica que mediante los diversos estudios de análisis de la composición de biopelículas del conducto radicular de los dientes con lesiones periapicales secundarias,

han mostrado resultados heterogéneos; también se han implementado nuevas técnicas de biología molecular que constituyen una alternativa de mayor utilidad para la caracterización de ciertos microorganismos, proporcionando un conocimiento adicional sobre la composición de la microbiota de origen endodóntico, permitiendo la detección de especies bacterianas difíciles o incluso imposibles de cultivar (6,7).

En 1983 el Dr. Kary Mullis concibió la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction- PCR) que se ha utilizado cada vez más en investigaciones, por ser capaz de detectar la presencia de ADN genómico de bacterias presentes en el espacio del conducto radicular con un alto grado de sensibilidad y especificidad (8,9).

En 1986 Pace et al., propusieron la técnica ARNr16S que permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas, permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables. Puede ser utilizada para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su ADN y para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo (7,10).

La Hibridación *in situ*, propuesta por Olsen pero introducida a la bacteriología en el año 1988 por Giovannoni et al., es utilizada en casos donde los microorganismos por estudiar resultan difíciles o imposibles de cultivar, como en el caso de las bacterias que requieren exigencias nutricionales y ambientales que los medios de cultivo no les proporcionan y se utiliza cuando la muestra del material por evaluar es insuficiente; también para la detección directa en tejidos, ya que se realiza en el contexto morfológico del tejido infectado confirmando en su caso, que el microorganismo está implicado en el proceso infeccioso (7,11).

En 1993 Fischer y Lerman, diseñan la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), la cual es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos, se utiliza como una estrategia básica para la caracterización microbiana mediante el uso del ADN metagenómico, es altamente sensible y confiable ya que es capaz de detectar por encima del 1% de la diversidad presente en una comunidad microbiana, incluyendo microorganismos no cultivables (12,13).

En 1994 Socransky et al., diseñó una técnica llamada de «checkerboard» (tablero de ajedrez) para hibridaciones DNA-DNA, esta permite identificar un gran número de bacterias a través de su genoma utilizando sondas de DNA en un gran número de muestras, es rápida, sensible y relativamente económica. Consiste en el cruzamiento de las muestras recogidas con las sondas de los microorganismos a estudiar, preparadas a partir de su ADN genómico. Las sondas de ADN genómico vienen siendo utilizadas extensamente en estudios evaluando la composición de placas subgingivales y la microbiota asociada con lesiones endodónticas(14,15).

En 1996, Pål Nyrén y su alumno Mostafa Ronaghi, publicaron su método de pirosecuenciación, siendo éste una de las tecnologías de secuenciación líder para los análisis de diversidad microbiana basados en ARNr 16S. La tecnología proporciona una gran cantidad de lecturas en una sola ejecución, lo que resulta

en una mayor profundidad de muestreo sin precedentes y permite la detección no sólo de los miembros dominantes de la comunidad, sino también de taxones de baja abundancia, la llamada biosfera rara.(16)

Diversos estudios con diferentes técnicas realizadas han revelado que los microorganismos en el fracaso del tratamiento de endodoncia son predominantemente anaerobios facultativos y gram positivos, siendo *E. faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia.(17)

*E. faecalis* es un coco grampositivo anaerobio facultativo, patógeno oportunista, que normalmente se aísla en la cavidad bucal, tracto gastrointestinal y tracto genitourinario, con una buena adaptación a ambientes con niveles ricos en nutrientes y bajos niveles de oxígeno y con ecología compleja. Sobrevive en entornos complejos como en temperaturas entre 10 ° - 60 °C, con un suministro deficiente de oxígeno y de nutrientes. También es capaz de sobrevivir a las soluciones de Hidróxido de Calcio, a pH alcalino de hasta 11.5 y con capacidad de formar biopelícula. Por último, puede utilizar fluidos del ligamento periodontal (LPO) como nutrientes y adherirse al colágeno(1,2).

A estos mecanismos también se agrega la capacidad del *E. faecalis* de sobrevivir en presencia de fármacos e irrigantes dentro de los conductos radiculares. Numerosos autores han demostrado que esta especie bacteriana resiste la acción del hipoclorito de sodio en concentraciones superiores al 5%. Además, de adquirir resistencia a los antibióticos, en particular a la eritromicina y azitromicina (1,18).

La capacidad de *E. faecalis* para crecer como una biopelícula en las paredes del conducto radicular y como una mono infección en los conductos tratados sin el apoyo sinérgico de otras bacterias favorece la alta resistencia a los agentes antimicrobianos haciéndolo un patógeno muy resistente al tratamiento del conducto radicular.(2)

Stuart et al. en 2006, indicó la capacidad de *E. faecalis* para alterar las respuestas del huésped, poseer enzimas líticas, mantener la homeostasis del pH, competir con otras células y utilizar el suero como fuente de nutrientes.(1)

Si bien algunos estudios moleculares han confirmado que *E. faecalis* es la especie más prevalente en casos fallidos, otros estudios han cuestionado su papel en los fracasos del tratamiento, ya sea por su ausencia o presencia en unos pocos casos y otras veces no como el taxón dominante, este microorganismo ha sido tan prevalente en casos tratados con enfermedad como en casos sin enfermedad.(6)

Endo et al. y Schirrmeister et al., en 2013, encontraron que el microorganismo más frecuentemente aislado fue *Parvimonas micra*.(1)

Pereira et al, en 2017, destacaron el *Fusobacterium nucleatum*, como la bacteria más prevalente (71,6%) en dientes con periodontitis apical postratamiento. Esto coincide con estudios similares de Siqueira et al., en donde también señala a ésta bacteria como la más prevalente (15%) y Rôças et al., con una prevalencia del 24%, como la segunda bacteria más frecuente.(1)

Henriques et al., en 2016 señalaron a *Corinebacterium diphtheria* como la bacteria más importante relacionada con la falla endodóntica.(1)

Rôças et al., aislaron *Propionibacterium acnes* (52%), como el microorganismo más frecuente presente en los casos de periodontitis apical postratamiento. Los mismos autores, en otro estudio identificaron a *Propionibacterium propionicum* como la segunda bacteria más prevalente (52%) después de *E. faecalis*.

Schirrmeister et al., confirmaron la presencia de *Propionibacterium acnes* en dientes con fracaso endodóntico.(1)

Nobrega et al., en 2013, destaca la importancia de *Treponema* en los casos que requieren un retratamiento endodóntico. Además, destacan otras dos especies: *Treponema denticola* y *Treponema maltophilum* (30,8%) y *Treponema vicentii*.(17,9%).(1)

Siqueira et al., señalan a *Candida albicans* como un microorganismo que siempre se ha asociado con el fracaso en endodoncia. Este hongo está presente en una mayor frecuencia, en dientes con lesiones periapicales persistentes (36,7%).(1)

También se han identificado muchas otras bacterias con altas prevalencias del 48% -60%: *Filiphactor alocis* 48%, *Dialister pneumosintes* 48% -58,3 %, *Pseudoramibacter alactolyticus* 52% y *Tannarella forsythia* 48,3%.(1)

Por otra parte, existen otros microorganismos que pueden aislarse con menor frecuencia en los conductos radiculares de dientes que presenten fracaso de origen endodóntico: *Pseudoramibacter*, *Novosphingobium*, *Ralstonia*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Enterococcus avium*, *E. faecium*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vagococcus*, *Enterobacterium granekis*, *Klembieli exigua*, *Actinomices georgiae*, *Dialister invisus*, *Megasphaera spp*, *Veillonella párvula*, *Tannarella forsythia*, *Synergistes spp*, *Propionibacterium acidifaciens*, *Streptococcus spp*, *Rahnella spp*, *Providencia stuartii*, *Prevotella denticola*, *Peptolitoralina*, *Coryin.*, *Actinomices gerencseriae*, *Veillonella spp*, *Rothia dentocariosa*, *clon oral de Lachnospiraceae*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Chloroflexigenomo spp*, *Capnocytophaga spp*, *Capnocytophaga sputigena*, *Actinomices spp*, *TM7 phylum spp*, *Leptotrichia spp*, *Dialister spp*, *Porphyromonas gulae*, *Desulfobulbus spp*, *Corynebacterium martuchotii*, *Biophila wadsworthia*, *Stofacterium spp*, *Euotbacterium spp. safenum*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella entérica*, *Mobiluncus mulieris*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides ureolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphiromonas endodonmetalís*, *Gebactobillium spp*, *Porphiromonas endodonmetalís*, *Gebappillum*, *Actinomices israelii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacilos entéricos*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomices spp*, *TM7 phylum spp*, *Leptotrichia spp*, *Dialister spp*, *Porphyromonas gulae*, *Desulfobulbus spp*, *Corynebacterium martuchotii*, *Biophila wadsworthia*, *Porphyromonas spp*, *Eubacterium spp*, *Prevotella oris*, *Streptococcus macrotiliainium p. agglomerans*, *Salmonella entérica*, *Mobiluncus mulieris*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides ureolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphiromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Rectinus spp*, *Campylocterium spp*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomices spp*, *TM7 phylum spp*, *Leptotrichia spp*, *Dialister spp*, *Porphyromonas gulae*, *Desulfobulbus spp*, *Corynebacterium martuchotii*, *Biophila wadsworthia*, *Porphyromonas spp*, *Eubacterium spp*, *Prevotella oris*, *Streptococcus macrotiliainium p. agglomerans*, *Salmonella entérica*, *Mobiluncus mulieris*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides ureolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphiromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Rectinus spp*, *Streptococcus gordonii*, *Corynebacterium martuchotii*, *Biophila wadsworthia*, *Porphyromonas spp*, *Eubacterium spp*, *Prevotella oris*, *Streptococcus sobrinus*, *Stenotrofomonas maltofilia*, *Eubacterium safenum*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Enterobacterus aglomerante*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*.

*Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Campylobacter rectus*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Actinomices israelii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacilos entéricos*, *Streptococcus gordonii*, *Corynebacterium martuchotii*, *Biophila wadsworthia*, *Porphyromonas spp*, *Eubacterium spp*, *Prevotella oris*, *Streptococcus sobrinus*, *Stenotrofomonas maltofilia*, *Eubacterium safenum*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Enterobacterus aglomerante*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Agripalidea*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Campylobacter rectus*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Actinomices israelii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacilos entéricos*, *Streptococcus gordonii*, *Salmonella entérica*, *Mobiluncus mulieris*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides ureolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Actylobacterium Bpp*, *Salmonella entérica*, *Mobiluncus mulieris*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides ureolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigescens*, *Gemella spp*, *Gemella morbillorum*, *Actylobacterium Bpp*.(1)

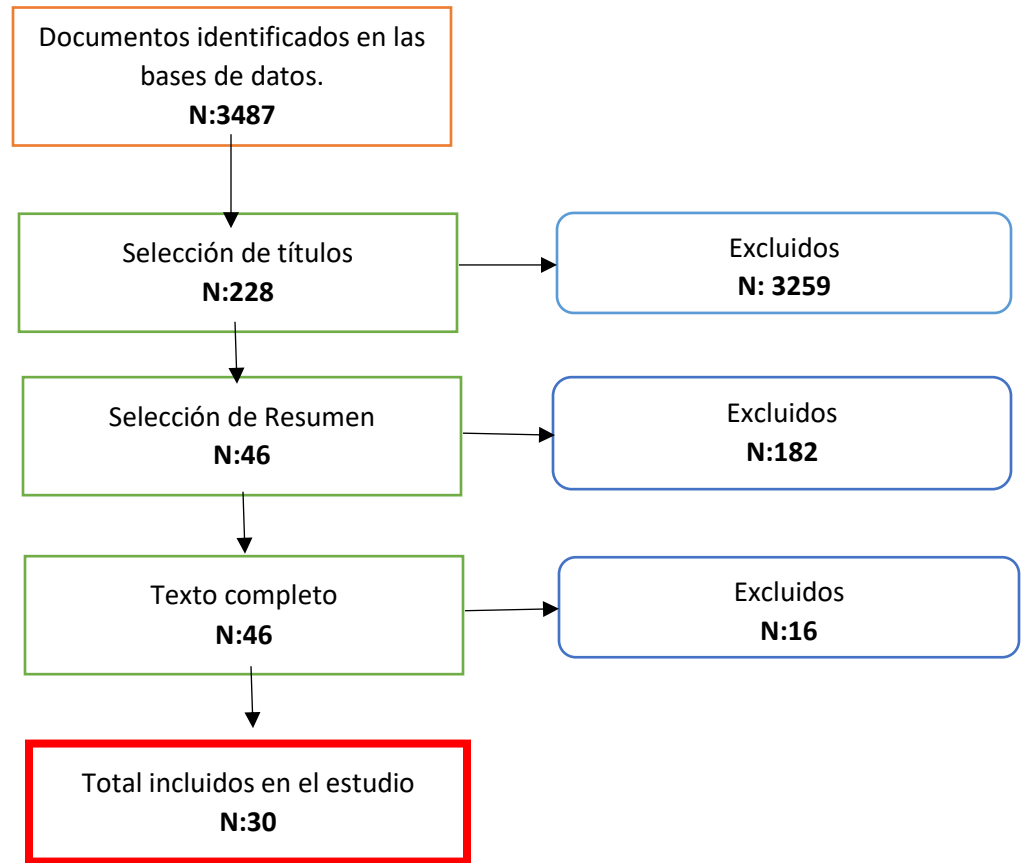
Recientemente Prada et al., en 2019 no destacan a *E. faecalis* como el principal responsable del fracaso en endodoncia. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es describir los microorganismos más frecuentes identificados con técnicas moleculares en muestras de lesiones secundarias en el tratamiento de endodoncia.

## **Materiales y Métodos**

La búsqueda de artículos fue realizada por un investigador en bases de datos Pubmed, Scopus, Google Scholar, Scielo y Redalyc, incluyendo estudios entre el período comprendido entre enero de 2000 hasta diciembre de 2020. Precizando los términos que permite determinar el objetivo de la revisión además de las palabras claves: Microbiology, biofilm, microbiota, endodontic treatment failure, secondary endodontic treatment, molecular techniques. Filtros como los operadores booleanos AND y OR, limitando el campo de búsqueda de estas palabras en el título y en el resumen. Para la selección de artículos como criterios de inclusión se determinó: “texto completo”, en inglés y español y artículos de investigación. Los criterios de exclusión fueron: artículos de “casos clínicos”, “serie de casos” “revisiones de literatura” “revisiones bibliográficas” “metaanálisis” y los artículos con fecha de publicación anterior a enero del año 2000 y posterior a diciembre de 2020.

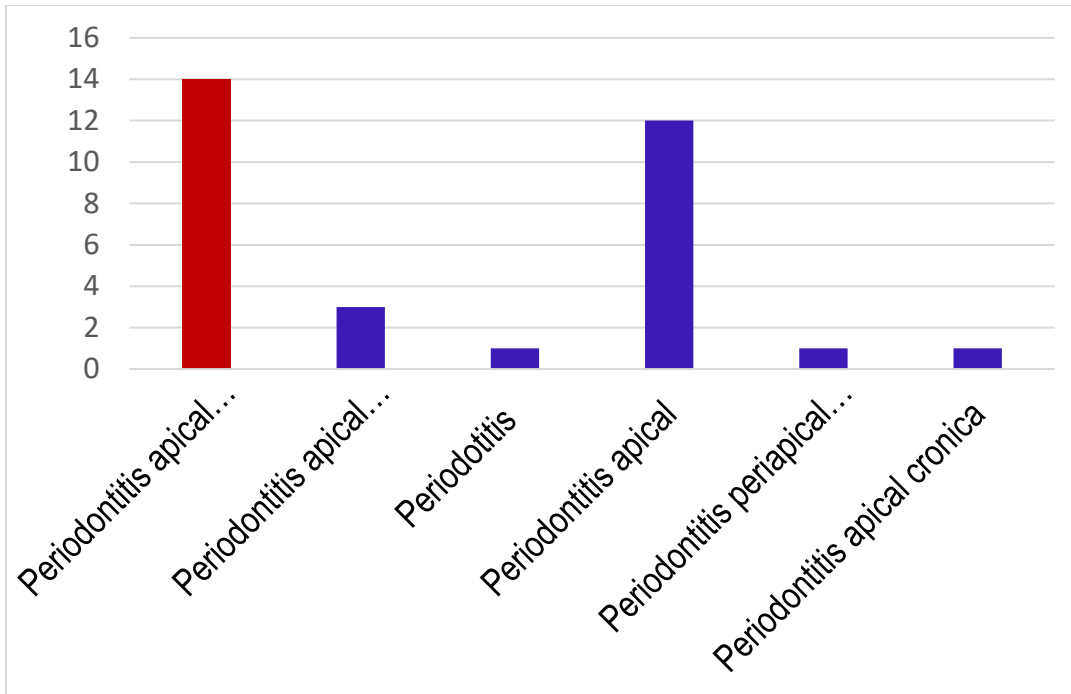
De 3.487 artículos encontrados y tomando en consideración los objetivos del trabajo se eliminaron 3.259 publicaciones, para un total de 228 estudios, de estos se descartaron 182 por lectura de resúmenes al no ser considerados con los criterios de inclusión para la revisión. Posteriormente de las 46 publicaciones restantes se tomaron en cuenta para lectura de texto completo, de los cuales se excluyeron 16 artículos por analizar solo lesiones primarias, por mostrar resultados en gráficos y no en números, por no mostrar prevalencia de cada microorganismo. Finalmente 30 artículos fueron considerados para esta revisión.(Figura 1.)

Figura 1. **Diagrama de Flujo**



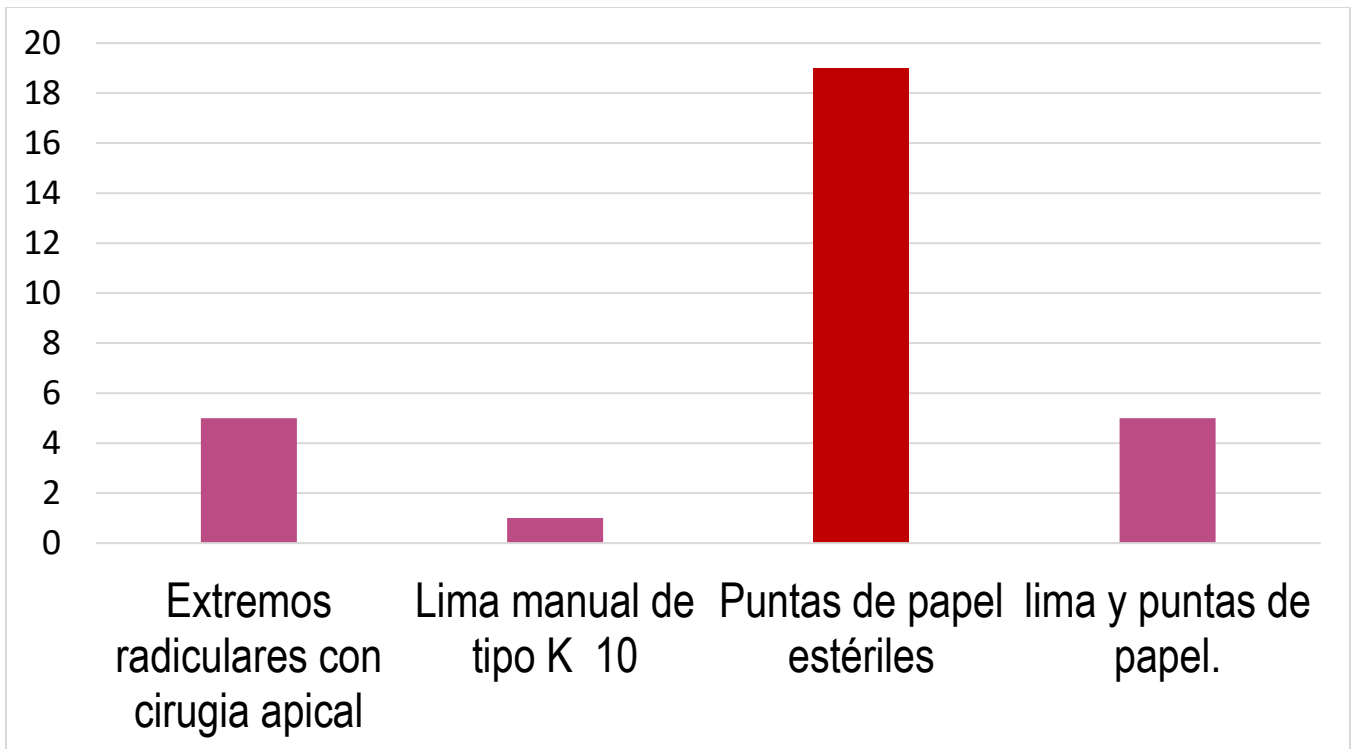
## Resultados

Figura 2. **Prevalencia de Diagnósticos**



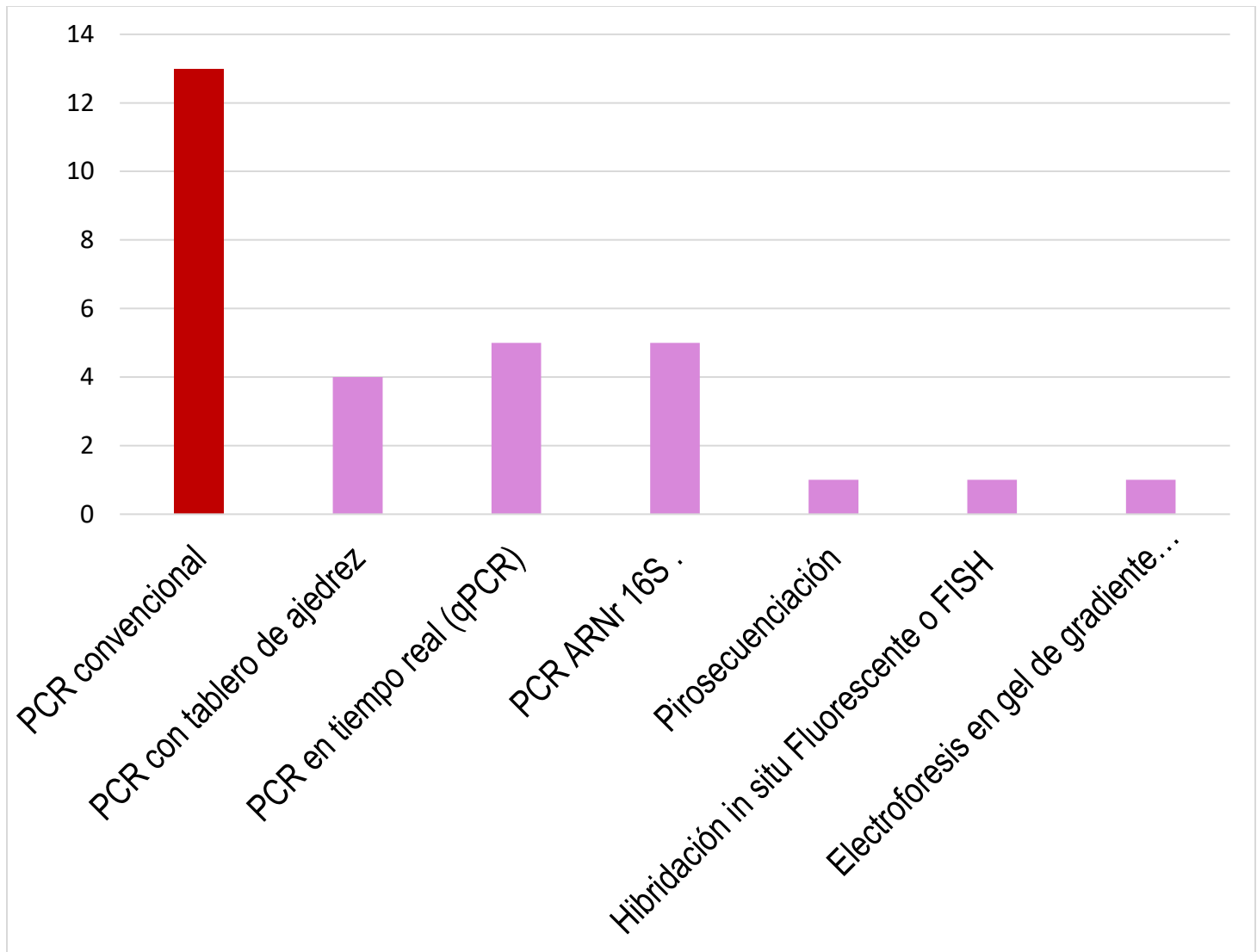
Con respecto al diagnóstico más prevalente en los 30 artículos de esta revisión, la periodontitis apical asintomática estuvo presente en 14 artículos, seguida de la periodontitis apical con 12 artículos y en tercer lugar tenemos a la periodontitis apical sintomática presente en 3 artículos.

Figura 3. **Tipo de muestra**



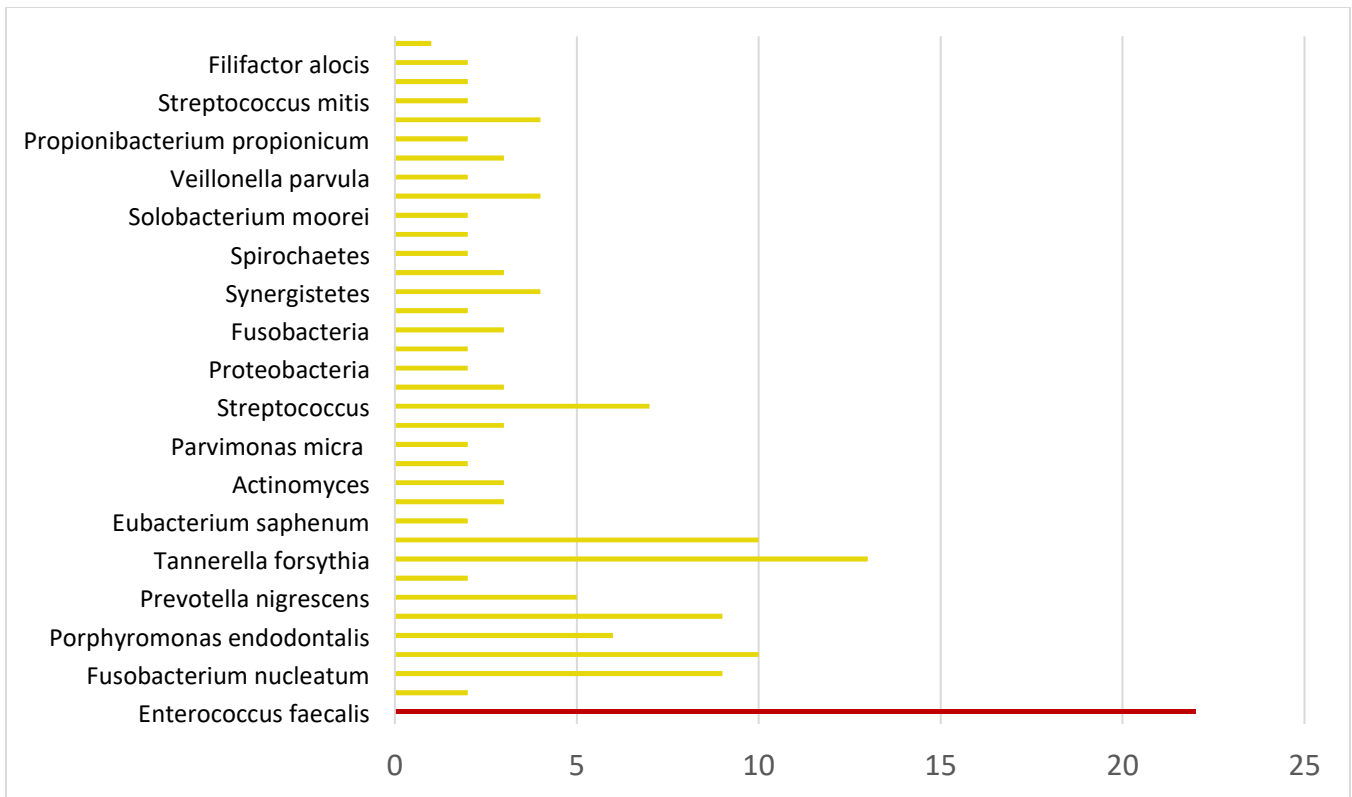
Dependiendo del tipo de muestra utilizada para la recolección de microorganismos, se observa a las puntas de papel con el mayor porcentaje estando presente en 19 artículos, seguido de Limas con puntas de papel y extremos radiculares con cirugía apical presentes en 5 artículos cada uno.

Figura 4. **Técnicas Moleculares utilizadas para el análisis microbiológico.**



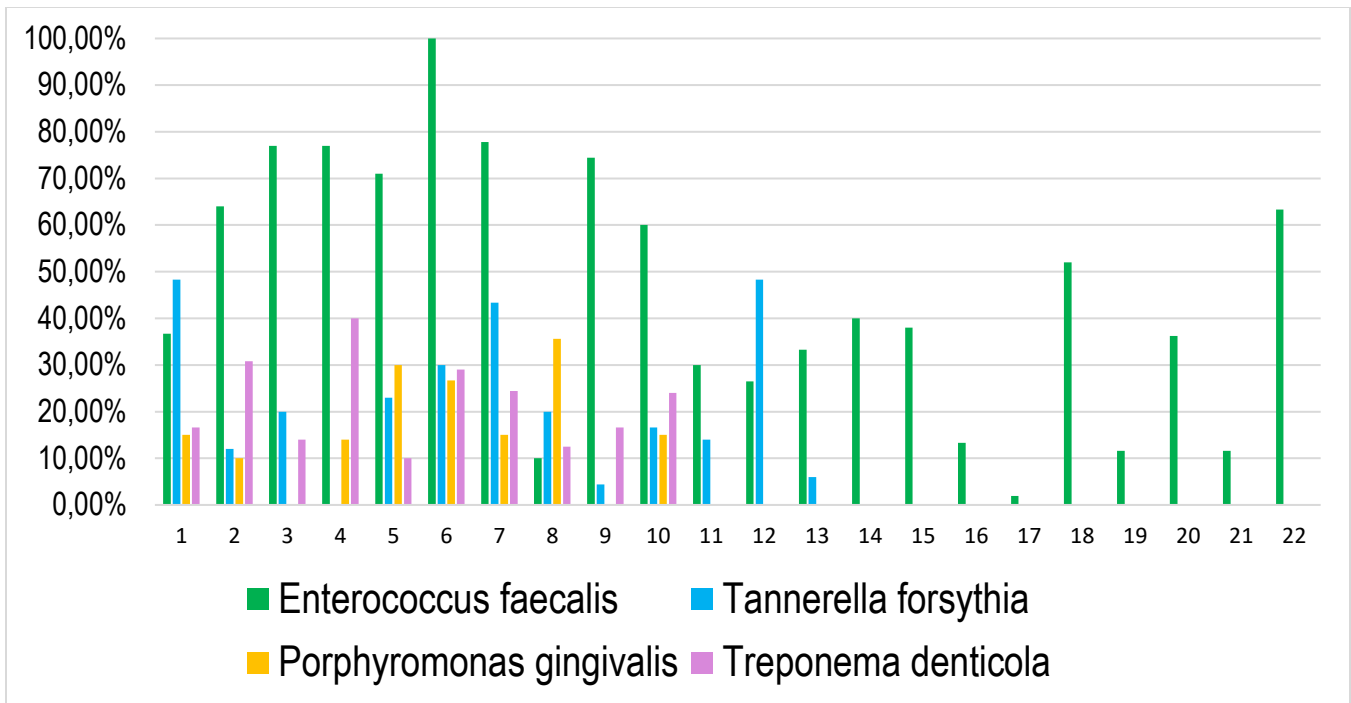
La técnica de PCR convencional es el método más utilizado para la identificación de microorganismos en la infección endodóntica secundaria esta fue utilizada (13 artículos) , seguida de qPCR y PCR ARNr 16S (5 artículos cada uno).

Figura 5. **Prevalencia de microorganismos investigados mediante las técnicas moleculares**



Se muestra que el microorganismo mayormente investigado en muestras con falla endodónica es *Enterococcus faecalis* (22 artículos), seguido de *Tannerella forsythia* (13 artículos) y *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* (10 artículos).

Figura 6. **Microorganismos más investigados y sus prevalencias.**



Los microorganismos más buscados como *E. faecalis* fue encontrado en 22 artículos y con una prevalencia entre el 10 al 100%, tenemos *Tannerella Forsythia* presente en 13 artículos y con una prevalencia entre 4,4 y 48,3%, *Porphyromonas gingivalis* con 10 artículos y una prevalencia entre el 10 y 35,6% y por último al *Treponema denticola* igualmente en 10 artículos y con una prevalencia entre 10 y 40%.

Figura 7. Microorganismos buscados con prevalencia nula.

PREVALENCIA NULA	
<i>Parascordavia denticolens</i>	0%
<i>Leptotrichia sp</i>	
<i>Lactobacillus sp</i>	
<i>Oribacter sp</i>	
<i>Sinergistetes</i>	
<i>Atopobium sp</i>	
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	
<i>Actinomyces israelii</i>	

Se muestra 8 microorganismos buscados en las lesiones endodónticas secundarias, pero no fueron encontrados presentando una prevalencia nula.

## DISCUSIÓN

Tradicionalmente, las bacterias de origen endodóntico se han estudiado mediante técnicas de cultivo, basada en el aislamiento, crecimiento e identificación en laboratorio de acuerdo con pruebas morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, se ha demostrado que el cultivo y otros métodos de identificación tradicionales tienen varias limitaciones con respecto a los diagnósticos microbiológicos. La última década ha traído muchos avances en el diagnóstico molecular microbiano, como la tecnología de PCR y sus derivados.(19)

Las técnicas de Biología Molecular han revolucionado el campo del diagnóstico microbiológico, constituyen la alternativa de mayor utilidad para la caracterización de ciertos microorganismos que presentan dificultad para su detección mediante los métodos convencionales. Esta revisión destaca a la PCR convencional como el método más utilizado en los últimos 20 años, para detectar microorganismos involucrados en el fracaso de la endodoncia. La PCR se basa en la replicación *in vitro* del ADN a través de ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión, con una mayor sensibilidad, especificidad, seguridad y rapidez, lo que permite detectar microorganismos no cultivables(20,21). Además, permiten una identificación más precisa de las cepas bacterianas cultivables con un comportamiento fenotípicamente divergente o convergente, se pueden usar de manera confiable durante la terapia antimicrobiana y no requiere de microorganismos viables para su detección, lo que es especialmente ventajoso en procesos infecciosos causados por bacterias anaerobias que pueden no sobrevivir al transporte y manipulación en la toma de muestras.(22)

Los enfoques de PCR han contribuido significativamente al conocimiento de la microbiota del conducto radicular ya que permiten el reconocimiento de nuevos patógenos endodónticos y fortalecen la asociación de algunas bacterias anaerobias cultivables pero exigentes con infecciones del conducto radicular.(22) Siqueira et al., (2003) (22) destacó a la PCR como una técnica rápida, sensible y más precisa en comparación con la técnica de cultivo e indicó su uso en endodoncia para investigar la microbiota asociada a conductos radiculares infectados; esto ha ampliado el conocimiento sobre las bacterias involucradas en la patogenia de las enfermedades perirradiculares. De igual manera Endo et al., en 2013 (23) indican que el uso de la PCR en su estudio les permitió detectar algunas especies de bacterias Gram negativas de difícil crecimiento, la prevalencia fue mucho más pronunciada con el uso de PCR a diferencia de aquellos que utilizan solo técnicas de cultivo, sin embargo, una desventaja de la PCR es que no puede determinar si el ADN diana proviene de bacterias vivas o muertas. Gomes et al., en 2005(24) muestran también una mayor sensibilidad de la técnica de PCR comparada con el cultivo para detectar anaerobios productores de pigmento negro en infecciones endodónticas primarias y en dientes con lesiones endodónticas secundarias. Por otra parte, Fouad et al., en 2002 (8) demostraron que después de la inoculación de tres bacterias endodontopatógenas en exposiciones de pulpa de ratón, la PCR fue mucho más precisa que el cultivo para detectar las bacterias anaerobias inoculadas.

Pereira et al., en 2017 (25) expresaron que la PCR se utiliza para la detección de ADN microbiano debido a que es un método altamente sensible con la capacidad de detectar bacterias aún no cultivadas. Sin embargo, debido a que el ADN bacteriano puede permanecer detectable por PCR durante un período prolongado después de la muerte celular, este examen puede sobrestimar potencialmente la verdadera carga bacteriana. Además, un simple examen microbiológico no puede determinar si las

bacterias específicas son los patógenos primarios o las especies transitorias permanentes que no están directamente relacionadas con la enfermedad. Los ensayos de PCR convencionales son cualitativos o se pueden ajustar para que sean semicuantitativos (19). Una de las posibles limitaciones del ensayo de PCR utilizado es que no proporciona resultados cuantitativos, resultando difícil determinar si las especies detectadas se producen en cantidades lo suficientemente grandes como para ser una carga importante y participar en el proceso infeccioso(21).

Fouad et al., en 2002(8) indican que la amplificación por PCR del gen de ARNr 16S es más sensible y más eficiente que el cultivo y que la identificación bioquímica de la flora endodóntica. De manera contraria Schirrmeister et al., en 2009(4), señalan que la identificación con un sólo método, como la PCR o la secuenciación del gen de rRNA 16S, podría dar lugar a falsos positivos para algunas bacterias, como con los estreptococos orales, lo que lleva a la necesidad de una combinación de métodos para confirmar resultados en su identificación. De igual manera Zarga et al., en 2019(26) concluyen que algunos microorganismos pueden existir en una cantidad muy pequeña, por lo que su ADN no puede detectarse mediante el método de secuenciación del ADN 16S. Una combinación del cultivo y de técnicas independientes del cultivo permitiría un análisis microbiano completo de las infecciones endodónticas.

Siqueira et al. (27), en su estudio compararon la capacidad de un ensayo de PCR basado en rDNA 16S y la hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez para investigar las bacterias que se encuentran en las infecciones de origen endodóntico, indicando que la PCR detectó bacterias con mayor frecuencia que el método del tablero de ajedrez por su mayor sensibilidad y especificidad.(27)

Shahi et al., en 2018(28), indican que las técnicas basadas en PCR de ARNr de 16 S no discriminan entre especies de microorganismos estrechamente relacionadas y altamente recombinantes; como también que la q-PCR, la señal fluorescente no puede distinguir productos de PCR inespecíficos de los específicos, indicando una vez más, que la PCR convencional es la técnica más precisa.(28)

Siqueira et al., (2011) (16) indican una alta posibilidad que la diversidad bacteriana de origen endodóntico permanezca subestimada debido a que se espera que la mayoría de los métodos moleculares utilizados revelen únicamente a los miembros dominantes de la comunidad bacteriana.(16)

Cabe resaltar, que la causa principal del fracaso en el tratamiento de endodoncia, es la presencia de microorganismos aislados como células planctónicas o biopelículas. Las biopelículas proporcionan a los patógenos un hábitat más favorable para vivir y una diversidad metabólica mucho más eficiente (25). Si estos microorganismos poseen patogenicidad y alcanzan un número suficiente obteniendo acceso a los tejidos perirradiculares, pueden inducir o mantienen la enfermedad perirradicular.(21)

Según los resultados de nuestra revisión, *E. faecalis* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia en las infecciones endodónticas secundarias, esto se debe a que numerosos estudios (4,26,29–32) han denominado a *E. faecalis* como el microorganismo principal de la falla endodóntica; sin embargo, en otros estudios *E. faecalis* no se destaca como el principal responsable del fracaso endodóntico. Aun así, casi siempre está presente pero en porcentajes menores como 13,33%, 11,6%, 0,52%, 12%, 30% y 1,9% en tre otros.(1)

El *Tannerella forsythia*, es un bacilo anaerobio, Gram negativo que pertenece al grupo de periodontopatógenos conocido como complejo rojo y se identifica frecuentemente en la placa obtenida de bolsas gingivales profundas. Los factores de virulencia incluyen gingivapaina, lipopolisacárido, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, propionato, isovalerato, fenilacetato y butirato. Estudios recientes han identificado este microorganismo en dientes con patologías endodónticas(33). Este microorganismo es

subestimado debido a su escaso crecimiento en los medios de cultivo y por su aparición inferior a los niveles de detección por el método de cultivo. Su presencia en las infecciones del conducto radicular fue descrita por primera vez por Conrads et al., mediante el uso de un método de PCR dirigido por ADNr 16S.(33) Numerosos estudios(6,21,26,34,35) han descrito a este microorganismos con altas prevalencias en infecciones secundarias como también responsable del fracaso endodóntico.

*Porphyromonas gingivalis* presenta factores de virulencia que incluyen lipopolisacárido, fimbrias, proteasas, fosfolipasa, fosfatasa alcalinas y ácidas, DNasa y RNasa, hemolisinas y metabolitos citotóxicos (sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, dimetil disulfuro, butirato, propionato, indol). Este desempeña un papel como colonizador temprano en la formación de biopelículas, se ha observado en estrecho contacto con la superficie de la raíz y participa en la adherencia inicial como colonizador temprano en la zona extrarradicular, así como en el fondo de las bolsas periodontales humanas. (36) También el análisis cuantitativo de las muestras a nivel del extremo de la raíz muestra una asociación significativa entre *T. forsythia* y *P. gingivalis*. Las asociaciones bacterianas, son de gran importancia teniendo en cuenta las relaciones endoperiodontales donde se observan comúnmente en una posible relación sinérgica, como informaron Siqueira y Roças (25)

Por otro lado, el *T. dentícola* es una bacteria anaerobia gramnegativa, enrollada de forma helicoidal y muy móvil. Asociada durante mucho tiempo con enfermedades periodontales graves, la cual también podría participar en la patogenia de las lesiones perirradiculares (33). Diversos estudios coinciden con los resultados obtenidos en nuestra revisión (25,26,37,38) reportando una asociación significativa de *T. dentícola* con lesiones perirradiculares de origen endodóntico.(33)

Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Blome et al., indicando que las especies del llamado 'complejo rojo', como son *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. dentícola*, presentan una alta asociación con infecciones endodónticas secundarias.(6)

Rocas et al, (2001) (39) encontraron a los miembros del complejo rojo estuvieron estrechamente asociados con la gravedad de las enfermedades periodontales y con los casos que utilizaron terapia periodontal.

Selcuk et al, (2010) (40) encontraron al "complejo rojo" en el 15,6% de las muestras tomadas de abscesos perirradiculares agudos.

Kumar et al, (2020) (41) indicó que el "complejo rojo" está directamente asociado con la gravedad de la enfermedad periodontal, pero se dispone de información limitada sobre el papel del complejo rojo en la lesión endodóntica.

Sin embargo, existen otros microorganismos como el *Fusobacterium nucleatum* y *Propionibacterium* con altos porcentajes de prevalencia en ciertos estudios, pero no son aislados con frecuencia. Estudios también destacan *Fusobacterium nucleatum*, como la bacteria más prevalente en dientes con periodontitis postratamiento. De igual manera numerosos autores identificaron a *Propionibacterium* como la segunda bacteria más prevalente después de *E. faecalis*, lo que indica que esta bacteria es resistente a las medidas de desinfección y tiene una capacidad para buscar alternativas de fuentes de nutrientes, resistir a las defensas del huésped, sobrevivir en el tejido de granulación presente fuera de los canales además de su capacidad de adhesión, coagularse y sobrevivir en áreas extrarradiculares.(1)

Por último, microorganismos con prevalencia nula en nuestros estudios, como son *Espiroquetas* (1), *Actinomyces israelii*, *Actinomyces nigrescens* (30), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (6), *Leptotrichia* sp., *Lactobacillus* sp., *Tannerella* sp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Parascordavia denticolens*, *Sinergistetes*, *Atopobium* sp., *Prevotella* sp., *Oribacter* sp.(42). Pero, al contrario de nuestro

estudio Figueiredo et al., (2018) (43) utilizando la tinción de Gram en lesiones periapicales encontraron *Prevotella*, *Tannerella*. De igual manera Prada et al., (2019) (1) publicó en su revisión los microorganismos aislados con menor frecuencia en los conductos radiculares como la *Tannarella*, *Prevotella*, *Actinomyces israelii*, *Pseudoramibacter alactolyticus*. Estos resultados pueden variar por la técnica utilizada o por los porcentajes menores de prevalencia que presenta cada microorganismo.

## Conclusión

Los estudios demuestran que las técnicas moleculares para el análisis microbiológico no están aún unificadas; por lo cual, no se puede determinar aún la prevalencia y frecuencia de microorganismos y su relación con la falla endodóntica. Los estudios se centran en buscar microorganismos más prevalentes, según la técnica utilizada. Se debe tener en cuenta, que las especies presentes en pequeñas cantidades y que no son objeto de estudio, pueden participar en el proceso infeccioso, siendo las especies de soporte o posiblemente tipos clonales virulentos, que incluso en cantidades reducidas pueden desempeñar un papel patológico importante en el desarrollo de la enfermedad perirradicular (21).

## BIBLIOGRAFIA

1. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2019;24(3):e364–72.
2. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2020;12(3):1–10.
3. Chércoles-Ruiz A, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review. *J Endod*. 2017;43(5):679–86.
4. Schirmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New Bacterial Compositions in Root-filled Teeth with Periradicular Lesions. *J Endod* [Internet]. 2009;35(2):169–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.024>
5. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res*. 2017;31:e108.
6. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):384–90.
7. Bustamante CC. *Microbiología de las Lesiones Pulpaes*. Vol. 27. 2009.
8. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3223–31.
9. Greif G. *Polymerase chain reaction*. . Institut Pasteur Montevideo. 2014. p. 19.

10. Rodicio MDR, Mendoza MDC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Form Médica Contin.* 2004;22(4):238–45.
11. Silva J, Rodríguez Y, Araya J, Gahona J, Valenzuelas N, Guerrero K, et al. Detección de genes de virulencia en cepas de enterococcus faecalis susceptibles y resistentes a aminoglucósidos. *Rev Chil Infectol.* 2013;30(1):17–22.
12. Fernández R, Le S. DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. *Herramientas Mol Apl en Ecol.* 2006;149–74.
13. Ccoscco RA. Evaluación de la diversidad metagenómica de una fuente termal del Santuario de Ampay-Apurímac, mediante el uso de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). 2017.
14. João Paulo Mardegan Issa ABCEC. USO DE LA TÉCNICA DE HIBRIDIZACIÓN CHECKERBOARD ADN-ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA PERIIMPLANTARIA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. *Acta Odontológica Venez [Internet].* 2008;46(3):1–6. Available from: [www.actaodontologica.com](http://www.actaodontologica.com/fuente:www.actaodontologica.com/ediciones/2008/3/ibridizacion_checkerboard_adnadm.asp)fuente:www.actaodontologica.com/ediciones/2008/3/ibridizacion\_checkerboard\_adnadm.asp
15. Flores AA. Investigación, pasión y conocimiento. *Rev Odontológica Mex.* 2010;14(3):6–7.
16. Siqueira JF, Alves FRF, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod.* 2011;37(11):1499–503.
17. Díaz A, editor. Aspectos relevantes de Enterococcus Faecalis y su participación en las infecciones de origen endodóntico. In: Aspectos relevantes de Enterococcus Faecalis y su participación en las infecciones de origen endodóntico [Internet]. Carlos Bóveda; 2002. p. 15. Available from: [http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado\\_55.htm](http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_55.htm)
18. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent J.* 2019;7(2):1–15.
19. Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Analysis of Enterococcus faecalis in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(5):370–4.
20. Romero Herazo Y, Díaz Caballero A, Arroyo Salgado B, Villalba Vizcaino V. Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica. *Duazary Rev Int Ciencias la Salud.* 2010;7(2):247–56.
21. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south Korean population. *J Endod.* 2004;30(7):504–8.
22. Siqueira JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003;31(5):333–9.
23. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPF. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the

endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013;7(3):302–9.

24. Gomes BPPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(4):211–5.
25. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe* [Internet]. 2017;48:12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.016>
26. Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: Bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol.* 2019;11(2):120–8.
27. Siqueira JF, Rôças IN, De Uzeda M, Colombo AP, Santos KRN. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol.* 2002;51(12):1090–6.
28. Shahi S, Zununi Vahed S, Fathi N, Sharifi S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;117(2017):983–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.085>
29. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001;34:1–10.
30. Siqueira JF, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *PLoS One.* 2016;11(9):1–14.
31. Henriques LCF, de Brito LCN, Tavares WLF, Teles RP, Vieira LQ, Teles FR, et al. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. *J Endod.* 2016;42(8):1239–45.
32. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006;32(3):173–7.
33. Gomes BPPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Molecular Analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* Associated With Primary Endodontic Infections and Failed Endodontic Treatment. *J Endod.* 2006;32(10):937–40.
34. Et P, Bpfa G, Ccr F, Fb T, Aa Z, Fj S. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:100–3.
35. Lin S, Sela G, Sprecher H. Periopathogenic Bacteria in Persistent Periapical Lesions: An In Vivo Prospective Study. *J Periodontol.* 2007;78(5):905–8.
36. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8738–43.
37. Nóbrega LMM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPPFA. *Treponema*

diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent*. 2013;7(1):61–8.

38. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF. Microorganisms in Root Canal-treated Teeth from a German Population. *J Endod* [Internet]. 2008;34(8):926–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.008>
39. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN, Coelho AMA. “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(4):468–71.
40. Ozbek SM, Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of “red complex” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2010;110(5):670–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.07.001>
41. Kishore Kumar Singh, Pankaj Kumar, Pragyam Das, Manjula Marandi, Swagat Panda, Amit Mahajan DK. Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study. *J Fam Med Prim Care* [Internet]. 2020;6(2):169–70. Available from: <http://www.jfmpc.com/article.asp?issn=2249-4863;year=2017;volume=6;issue=1;spage=169;epage=170;aulast=Faizi>
42. Chugal N, Wang JK, Wang R, He X, Kang M, Li J, et al. Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *J Endod* [Internet]. 2011;37(10):1359–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.020>
43. Gomes BPF de A, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res*. 2018;32:82–110.