



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**IMPORTANCIA DE LA RELACIÓN ENTRE LA BIOPELÍCULA
INTRACONDUCTO E INFECCIONES PERIAPICALES.**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

DAFNE ALEJANDRA MONTES MORATILLA

TUTORA: MTRA. ISABEL MARTÍNEZ SANABRIA

ASESORA: MTRA. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología por brindarme la oportunidad y las herramientas para terminar con éxito mi educación profesional.

A mis padres, hermano, familia presente y no presente por su motivación, confianza, apoyo y compañía durante este largo camino.

A la C.D. Leticia Pineda Rodríguez por compartir conmigo sus experiencias, conocimientos y sobre todo su amistad.

A la Mtra. Isabel Martínez Sanabria y a la Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández por su guía y dedicación en la realización de este trabajo.

A todos mis profesores por enseñarme y compartir sus conocimientos, los cuales aplicaré con mucho orgullo y sobre todo, a aquellos que me motivaron a siempre ser la mejor.

Y con mucho cariño a todos mis amigos con los que compartí mis mejores momentos y principalmente a aquellos que, en mis malos momentos me tuvieron paciencia y me apoyaron cuando más lo necesitaba.

Importancia de la relación entre la biopelícula intraconducto e infecciones periapicales

I. Introducción.....	5
II. Justificación.....	7
III. Objetivos.....	7
IV. Desarrollo.....	8
1. Biopelículas microbianas.....	8
1.1. Antecedentes.....	8
1.2. Definición de biopelícula.....	10
1.3. Formación y desarrollo de una biopelícula.....	11
1.4. Mecanismos de adaptación de una biopelícula.....	14
1.4.1. Interrelaciones microbianas.....	15
1.4.2. Quorum sensing.....	16
1.4.3. DNA extracelular en una biopelícula.....	18
1.5. Biopelículas bacterianas.....	20
1.6. Biopelículas fúngicas.....	27
2. Microbiota endodóntica y formación de biopelícula intraconducto.....	34
2.1. Infección pulpar.....	34
2.1.1. Vías de infección pulpar.....	34
2.1.2. Clasificación de las infecciones pulpares.....	36
2.1.3. Factores de virulencia microbianos.....	37
2.1.4. Fisiopatología de las infecciones intraconducto.....	43
2.2. Microbiota de las infecciones intraconducto.....	45

2.3. Biopelícula intraconducto	48
2.3.1. Factores que influyen en la formación de la biopelícula intraconducto	53
2.4. Respuesta inmunológica en la infección pulpar	55
3. Microbiota de las infecciones periapicales y formación de biopelícula	58
3.1. Infección periapical	58
3.1.1. Vías de infección periapical	58
3.1.2. Clasificación de las infecciones periapicales	60
3.1.3. Fisiopatología de las infecciones periapicales	61
3.2. Microbiota de las infecciones periapicales	62
3.3. Biopelícula extrarradicular	65
3.4. Respuesta inmunológica en las infecciones periapicales	69
4. Relación de las lesiones endoperidontales	76
4.1. Anatomía e intercomunicaciones entre el conducto radicular y el periodonto	76
4.2. Clasificación de las lesiones endo-periodontales	77
4.3. Bacterias persistentes en los conductos radiculares y lesiones periapicales después del tratamiento endodóntico	78
4.4. Transformación microbiana de la microbiota normal a patógena	83
V. Discusión	84
VI. Conclusiones	87
VII. Referencias bibliográficas	88

I. Introducción

Los microorganismos pueden encontrarse en la naturaleza, libres en un medio líquido como bacterias en estado planctónico, o en colonias definidas como biopelículas. Se ha encontrado que el 99% de todas las células bacterianas existen en forma de biopelículas y tan sólo el 1% vive en estado planctónico.

Las biopelículas microbianas son comunidades complejas de microorganismos que se encuentran adheridos a una superficie sólida y coagregados entre sí, que por medio de señales químicas se organizan y forman una estructura cubierta por una matriz de polisacáridos, que estos mismos producen. Esta matriz constituye el 85% del volumen total de una biopelícula, se compone en un 80% de agua y un 20% de materia orgánica e inorgánica. Las características de una biopelícula dependen de las especies microbianas que la conforman, de la composición y estructura de la superficie, y de la capa que recubre la superficie sobre la que se forman.

La biopelícula al estar compuesta por múltiples especies que interactúan entre sí y con su medio ambiente, brinda una protección frente a los cambios que puedan presentarse en su medio, les permite la obtención de nutrientes y facilita la eliminación de desechos. Por lo que, la formación de biopelículas es considerada un medio de supervivencia de células procariontes.

El establecimiento de una comunidad se considera esencial para el crecimiento y la supervivencia microbiana en la cavidad bucal, muchas de las enfermedades infecciosas que se presentan en ella son causadas o exacerbadas por dichas biopelículas microbianas y la respuesta inmune del huésped. Como ejemplo de esto, tenemos a las infecciones periapicales donde su etiología principal está relacionada con los microorganismos provenientes del conducto radicular necrótico y de la interacción de estos con las células del sistema inmune localizadas en los tejidos periapicales.

Los microorganismos patógenos que invaden el tejido pulpar pueden asociarse y promover el desarrollo de una biopelícula intraconducto, así como inducir y prolongar el proceso inflamatorio hasta la muerte del tejido pulpar. Estos microorganismos posteriormente pueden diseminarse fuera de conducto radicular y provocar una respuesta inflamatoria en los tejidos periapicales, como consecuencia de esto se desarrollará un proceso infeccioso y una lesión periapical. La evidencia científica indica claramente que los microorganismos son esenciales para la progresión y persistencia de diferentes formas de infección periapical.

II. Justificación

La descripción bibliográfica que se enfoca al estudio de la microbiota que puede conformar la biopelícula intraconducto y la biopelícula extrarradicular, nos permitirá ayudar al entendimiento de cuáles son las relaciones interbacterianas que garantizan la supervivencia de los microorganismos dentro de los conductos radiculares, así como las características que les permite adherirse, colonizar e invadir eventualmente los tejidos dentales y periapicales. Tomando en cuenta que estas características son primordiales en el inicio y progresión de las lesiones periapicales, esta información en la práctica clínica, nos guiará en el diagnóstico y tratamiento dirigido a la etiología microbiológica específica de infecciones pulpares.

III. Objetivos

Objetivo general

Conocer y comprender la importancia de las interrelaciones existentes entre los microorganismos que conforman la biopelícula intraconducto, y su relación con las infecciones periapicales, por medio de una revisión bibliográfica.

Objetivos específicos

1. Definir que es una biopelícula y describir su conformación estructural por medio de artículos de coagregación y formación de biopelículas orales.
2. Conocer los microorganismos presentes en el conducto radicular y como conforman la biopelícula intraconducto en estudios microbiológicos de reciente aparición.
3. Determinar la importancia de la biopelícula intraconducto y su relación directa o indirecta con la microbiota e infección de los tejidos periapicales.
4. Determinar la importancia de la estrecha relación anatómo-fisiológica que existe entre el tejido pulpar y periapical que puede favorecer a la diseminación de microorganismos de un tejido a otro, ante una infección.

IV. Desarrollo

1. Biopelículas microbianas

1.1. Antecedentes

Aunque durante mucho tiempo se sospechó de la existencia de criaturas demasiado pequeñas para ser percibidas a simple vista, su descubrimiento estuvo relacionado con la invención del microscopio. Robert Hooke en 1665, escribió un libro dedicado a observaciones microscópicas titulado *Micrographia*, en el describió los cuerpos fructificantes de los mohos, representando la primera descripción conocida de los microorganismos. En 1676, Anton Van Leeuwenhoek, que ya conocía el trabajo de Hooke, empleó microscopios simples de luz que el mismo construyó para examinar el contenido microbiano de varias sustancias naturales, siendo así el primero en describir la presencia de microorganismos adheridos a las superficies dentales, a los que denominó “animálculos”, que más tarde se les daría el nombre de bacterias. Pasados los años, sus observaciones fueron confirmadas por otros investigadores. En el siglo XIX, cuando los microscopios fueron mejorados y se generalizó su uso, fue así como el estudio de la vida microbiana se retomó [Madigan 2009].

La adhesión microbiana a superficies ha sido reconocida por varias décadas. Ya por los años 70, los microbiólogos plantearon que, probablemente, la mayor parte de las bacterias en la naturaleza existía en estado de biopelículas [Thomas 2006; Donlan 2002]. En el año de 1978, Costerton y cols., describieron la presencia de comunidades bacterianas embebidas en una matriz de glucoproteína unidas a superficies en contacto con el agua, postulando que las biopelículas podrían ser la explicación para los mecanismos por los cuales los microorganismos se adhieren a superficies vivientes e inertes, diferenciándose profundamente de sus homólogas que se encuentran suspendidas en un medio líquido, es decir, en su forma planctónica [Costerton 1978].

Gibbons en 1978, realizó los primeros informes de la relevancia clínica de lo que hoy conocemos como las biopelículas bacterianas cuando publicó sus observaciones sobre el papel de la formación glicocálix en los dientes por *Streptococcus mutans*. A medida que la relevancia clínica de la formación de biopelículas bacterianas cada vez era más evidente, el interés por saber de este fenómeno aumentó [Jefferson 2004].

El concepto de biopelícula aparece con Costerton en los años 90, un concepto microbiológico que posteriormente se adaptó a la odontología, y según el cual *“la placa dental es un modelo de comunidad organizada compuesta de bacterias, adheridas a una superficie sólida, bañadas por un medio líquido, que necesitan de sistemas de comunicación, de nutrición, autodefensa y competencia interbacteriana para que se mantengan”* [Costerton 1995].

Donlan en el 2002, efectuó una descripción ampliamente aceptada de biopelícula, estableciendo que *“es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”* [Donlan 2002].

La observación directa de la mayoría de los hábitats naturales de los microorganismos ha demostrado que estas biopelículas tienen funciones cooperativas relativamente complejas y coordinadas aunque la mayoría de los microorganismos pueden tener una existencia planctónica, con un estilo de vida independiente en los cuales sus funciones forman así parte integral de una comunidad [Thomas 2006].

Con la llegada del microscopio electrónico consiguió lograr un examen detallado de las biopelículas. En las últimas dos décadas gran parte del trabajo realizado para la descripción de estas se basó en la microscopía electrónica de

barrido. Recientemente, dos grandes avances han incrementado substancialmente la comprensión de las biopelículas: la utilización del microscopio láser confocal que ha permitido caracterizar la ultraestructura de una biopelícula y la investigación de los genes involucrados en la adhesión celular y la formación de una biopelícula **[Nazar 2007]**.

Sin embargo, para la terapéutica de la mayoría de las infecciones humanas continúa basándose en el estudio de las minoritarias bacterias planctónicas, debido entre otras razones, a que la investigación de las biopelículas microbianas es más difícil que aquéllas respecto a los microorganismos planctónicos **[Donlan 2002; Thomas 2006]**.

1.2. Definición de biopelícula

La biopelícula se define como un modo de crecimiento microbiano complejo y organizado, donde una o más comunidades de células microbianas interactúan de manera dinámica entre sí; se unen a un sustrato sólido y también a otras células o comunidades. Estas a su vez, se encuentran embebidas en una matriz compuesta de sustancias poliméricas extracelulares que estos mismos producen, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos **[Flemming 2010]**; esta matriz juega un papel importante en la estructura de una biopelícula, en la agregación y en la plena expresión de la virulencia de varios microorganismos patógenos **[Costerton 1994; Branda 2005]**.

La existencia y formación de una biopelícula permite que los microorganismos (bacterias e incluso hongos) se multipliquen sobre una superficie, asegurando su supervivencia en su medio, por esta razón se considera como un mecanismo de protección y defensa microbiana. Las biopelículas también pueden facilitar el procesamiento y absorción de nutrientes, alimentación cruzada (una especie le proporciona nutrientes a otra), eliminación de productos metabólicos potencialmente dañinos (a menudo, mediante la utilización por otras bacterias) y el desarrollo de un entorno apropiado **[Socransky 2002]**.

1.3. Formación y desarrollo de una biopelícula

Los microorganismos pueden formar biopelículas sobre cualquier superficie que esté cubierta por un líquido que contenga nutrientes. Los tres componentes principales que intervienen en su formación son las células microbianas, una superficie sólida y un medio fluido.

Los microorganismos que viven en una biopelícula deben tener los siguientes cuatro criterios **[Caldwell 1997]**:

1. Poseer la habilidad de auto-organizarse (autopoiesis).
2. Resistencia a las perturbaciones ambientales (homeostasis).
3. Ser más eficaz en una asociación que en el aislamiento (sinergia).
4. Responder a los cambios del medio ambiente como una unidad en lugar de un solo individuo (comunalidad).

Por lo tanto, para que una bacteria pueda convertirse en un miembro productivo de una comunidad debe diferenciarse y asociarse a la biopelícula, reprimiendo la síntesis del flagelo que podría desestabilizar su estructura; y producir exopolisacáridos que la refuercen **[Watnick 2000]**.

La formación de biopelículas se produce en 5 etapas:

- **Etapa 1:** Adsorción de moléculas inorgánicas y orgánicas a la superficie sólida (acondicionamiento de la superficie). Cambia las propiedades químicas y físicas de la interfase superficie/fluido, tornándola más adecuada para la adhesión microbiana.
- **Etapa 2:** Adhesión de las células planctónicas a la superficie acondicionada. Existen factores que pueden afectar la unión microbiana como pH, temperatura, energía superficial, la disponibilidad de nutrientes, tiempo de contacto de los microorganismos, carga de la superficie celular microbiana e hidrofobicidad de

la superficie. La interacción de los microorganismos con la superficie puede ocurrir en tres formas:

a) Transporte del microorganismo a la superficie puede estar mediada por fimbrias, pilis, flagelos y exopolisacáridos (EPS).

b) Adherencia microbiana a la superficie no específica. Se puede dar por la atracción electrostática, covalente, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacción hidrófoba.

c) Adherencia microbiana al sustrato de forma específica (adhesina-receptor). La adhesina o ligando de la superficie celular microbiana se une a los receptores de la superficie o sustrato.

- Etapa 3: Desarrollo y extensión de la biopelícula. La monocapa de microorganismos atrae colonizadores secundarios que forman microcolonias y la colección de microcolonias da lugar a la estructura final de la biopelícula [**Costerton 1999; Cowan 1987**].
- Etapa 4: Maduración de una biopelícula. Se forma una arquitectura compleja con pilares, canales de agua, poros y redistribución de microorganismos sobre la superficie como se observa en el esquema (**Fig. 1**). La densidad poblacional y la complejidad de la biopelícula aumenta a medida que los microorganismos adheridos se replican y mueren; además los componentes extracelulares de los microorganismos interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante [**Davies 1998**].
- Etapa 5: Liberación de células de la biopelícula (individuales o en grupo). Es un evento fisiológicamente regulado, la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas puede conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes óptimos. El desprendimiento se puede dar por tres mecanismos:
 - a) Erosión: Remoción continua de pequeñas partes de la biopelícula.

- b) Separación: Remoción rápida y masiva. La separación es menos frecuente que la erosión, se cree que deriva de la disminución de nutrientes u oxígeno (O₂) en el interior de una biopelícula voluminosa.
- c) Abrasión: Liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con la biopelícula. [O'Toole 2000].

Las células de la biopelícula dispersadas pueden revertir su estado a un crecimiento planctónico y de esta manera, el desarrollo de vida de una biopelícula se transforma en un ciclo completo, como podemos observar en el esquema (Fig.2)



Figura 1. Representación de una biopelícula madura. Formación de una arquitectura compleja con pilares, canales, poros y redistribución de microorganismos en el sustrato.

[Sauer 2002].

También podemos encontrar células planctónicas que mantienen su asociación con la biopelícula durante largos períodos de tiempo, nadando entre los pilares y que pueden permanecer o salir de ella con el propósito de ocupar nichos distintos

dentro de la biopelícula o de compartir su material genético en respuesta a las condiciones del medio [Watnick 2000]. El abandono de la biopelícula se puede dar por medio de enzimas que les puedan permitir una salida a los microorganismos [Allison 1998].

El medio ambiente en una biopelícula no es homogéneo, por lo que, los diferentes microorganismos que lo conforman responden a las condiciones de sus microambientes específicos presentándose diferentes patrones de crecimiento. La cooperación fisiológica es el factor principal que ayuda a conformar su estructura y

al madurar las convierte en comunidades microbianas eficientes [Donlan 2002] y resistentes al sistema inmune del huésped [Leid 2005].

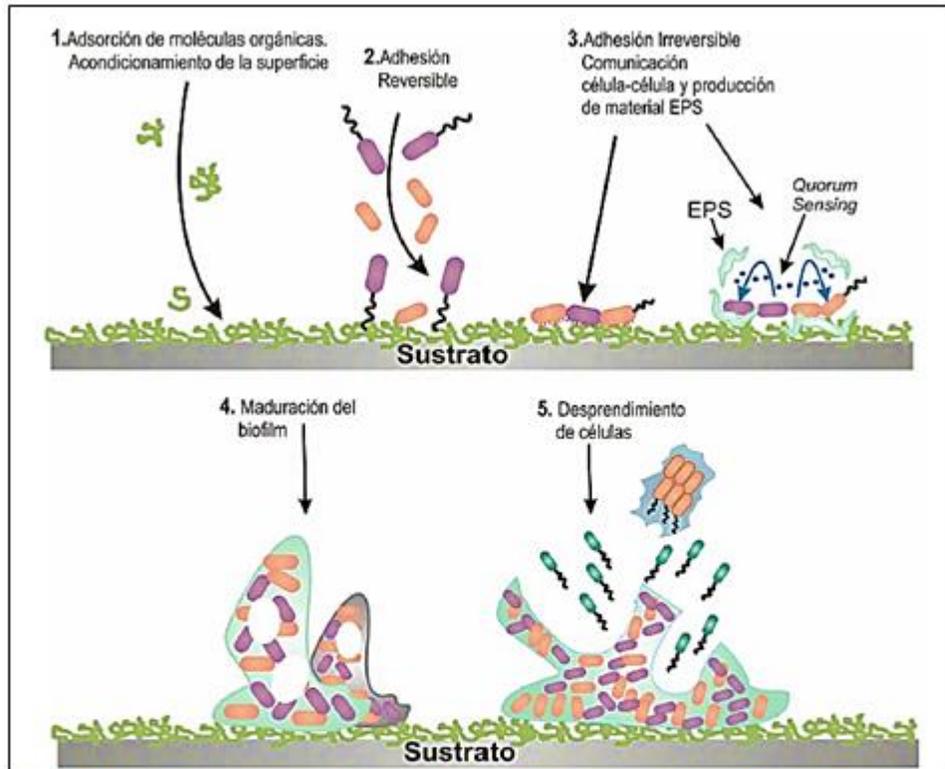


Figura 2. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de una biopelícula sobre un sustrato. 1) Adsorción de moléculas inorgánicas y orgánicas a la superficie sólida (acondicionamiento de la superficie). 2) Adhesión de las células planctónicas a la superficie acondicionada. La adherencia microbiana al sustrato no se produce de manera específica. 3) Adherencia microbiana al sustrato de forma específica (adhesina-receptor). La adhesina o ligando en la superficie celular bacteriana se une a los receptores del sustrato. Desarrollo y extensión de la biopelícula. 4) Maduración de la biopelícula. Se forma una arquitectura compleja. 5) Liberación de células (individuales o en grupo) de la biopelícula o sustrato.

1.4. Mecanismos de adaptación de una biopelícula

Los microorganismos que conforman una biopelícula tienen una serie de estrategias para asegurar su permanencia sobre una superficie. La formación de una biopelícula les permite soportar una amplia gama de modificaciones fisiológicas y morfológicas que surgen en respuesta a los cambios de su ambiente.

Los diferentes gradientes de productos químicos, de nutrientes y la presencia o no de oxígeno establecen microambientes a los que las bacterias deben adaptarse para sobrevivir. Por lo tanto, la integridad de la biopelícula es mantenida por las interacciones microbianas, adhesión, señalización celular por medio del contacto de célula a célula, comunicación metabólica y la detección de quórum. La percepción y el procesamiento de la información química del entorno forman una parte central del control regulador de estas respuestas adaptativas [Swift 2001; Blango 2009].

1.4.1. Interrelaciones microbianas

Las comunidades microbianas interactúan y cooperan de varios modos, estas relaciones pueden ser beneficiosas o perjudiciales para el equilibrio dinámico con su medio ambiente. La cercanía de los microorganismos dentro de la biopelícula facilita estas interacciones bioquímicas, los microorganismos que conforman una biopelícula no están distribuidos al azar, sino más bien, organizadas para satisfacer mejor las necesidades de cada uno [Watnick 2000].

Interacciones sinérgicas

El crecimiento microbiano dentro de una comunidad puede traer ventajas metabólicas y el acceso a nutrientes que no estarían disponibles para las células planctónicas. La competencia por los nutrientes es uno de los determinantes ecológicos que dicta la prevalencia de una especie en particular en la biopelículas, por ejemplo las bacterias son capaces de colaborar para la degradación de moléculas complejas del huésped que actúan como sustrato primario para ellas. Diversas especies evitan la competencia directa de los nutrientes individuales para coexistir, donde los productos del metabolismo de un microorganismo se convierten en la fuente principal de otro.

Otra interacción beneficiosa que encontramos es la coagregación que ayuda a la colonización de las superficies y también facilita las interacciones metabólicas entre las especies mutuamente dependientes **[Wright 2013]**.

Interacciones antagónicas

Los microorganismos no siempre son bien recibidos en una comunidad, en las relaciones antagónicas las diversas poblaciones microbianas compiten por nutrientes, espacio y sitios de adhesión. Algunos de sus productos metabólicos se pueden acumular en concentraciones que pueden ser tóxicas para otras especies.

Algunas especies bacterianas han desarrollado mecanismos específicos para inhibir el crecimiento y la adhesión de microorganismos competidores. Por ejemplo, las bacteriocinas son compuestos bactericidas que producen algunas especies bacterianas que les permite eliminar microorganismos competidores. Otro ejemplo de antagonismo podría ser el desprendimiento de microorganismos de la biopelícula **[Wright 2013]**. Por lo tanto, estas interacciones de sinergismo y antagonismo entre los microorganismos, desempeñan una función en el establecimiento y regulación de una comunidad.

1.4.2. Quorum sensing

La unión de los microorganismos a una superficie y la posterior formación de una biopelícula requieren de señales químicas coordinadas, capaces de inducir diferentes fenómenos en las células planctónicas como activar su diferenciación como biopelícula **[Donlan 2002]**. En una biopelícula también los mecanismos de señalización son mayores por la proximidad que tienen los microorganismos que la conforman.

El Quorum sensing es un medio de comunicación entre los microorganismos que se lleva a cabo por medio de pequeñas moléculas señalizadoras (autoinductores), que permiten a los microorganismos ponerse en contacto con los

tejidos del huésped **[Wright 2013]**, detectar la presencia de los microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente, regular la expresión de genes específicos y responder a condiciones cambiantes del medio **[Prosser 1999]**. Por lo tanto, el Quorum sensing puede regular el crecimiento y maduración de la biopelícula, plásmidos, la motilidad de las bacterias, la producción de metabolitos secundarios, la activación de genes para la producción de factores de virulencia y la simbiosis entre géneros bacterianos **[Kumar 2009; Joint 2007]**.

El Quorum sensing depende de la densidad celular, por ejemplo, en la biopelícula bacteriana cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señalizadora, de tal manera que, mientras más bacterias se unen se incrementa la concentración local de estas señales aumentando así la densidad celular. Las principales moléculas empleadas por las bacterias para comunicarse con otras son: las lactonas N-acil homosiderina (HSLs) en bacterias Gram negativas y los péptidos en Gram positivas, estas son liberadas cuando la densidad celular alcanza una concentración crítica. Las bacterias poseen un receptor que puede detectar de manera específica una molécula señalizadora, esta al unirse a su receptor activa la transcripción de determinados genes incluyendo aquellos para la síntesis de un inductor como podemos ver en la **(Fig. 3) [Parsek 2009; Thomas 2006]**.

En el caso de las biopelículas fúngicas como la que forma *Candida albicans*, las principales moléculas de señalización empleadas para comunicarse son el farnesol, tirosol y dodecanol. El aumento de la densidad celular influye principalmente en la morfología de este hongo, cuando aumenta la densidad celular promueve el crecimiento de la levadura, mientras que los niveles bajos favorecen la formación de hifas **[Albuquerque 2012; Hornby 2001; Chen 2004; Hall 2011]**.

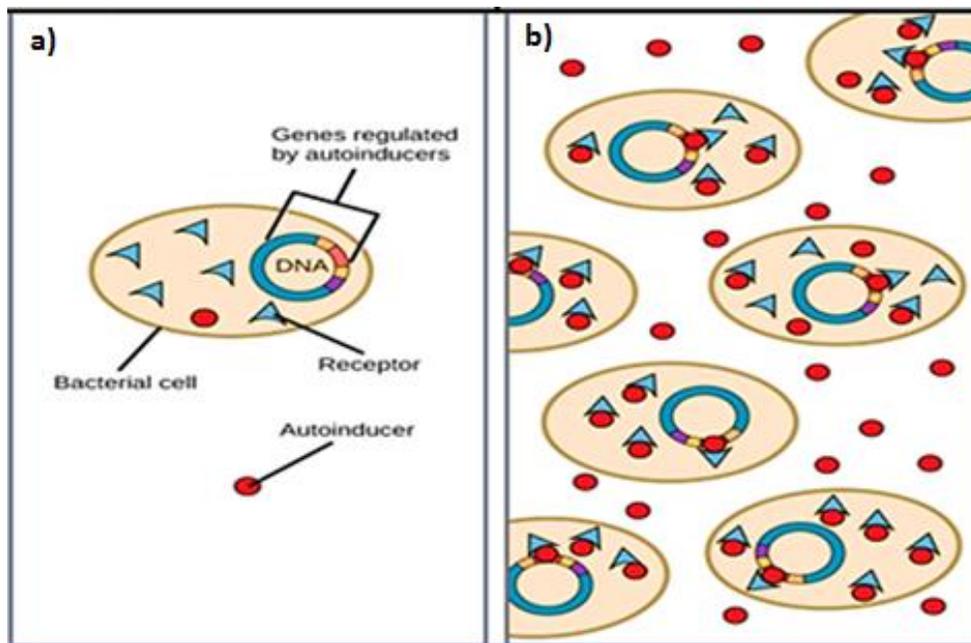


Figura 3. Secreción y detección de moléculas autoinducidas o de señalización por unión a su receptores en las bacterias. a) Cuando la densidad celular es baja, los autoinductores se difunden fuera de la célula. b) Cuando la densidad celular es alta, más autoinductores están presentes uniéndose a receptores que regulan la transcripción de ciertos genes. Los genes responsables de la producción de autoinductores se expresan, dando como resultado una retroalimentación positiva.

1.4.3. DNA extracelular en una biopelícula

Los medios de adaptación que tienen las comunidades bacterianas esta determinada por la expresión génica dentro de la biopelícula. Una fracción significativa de la matriz de la biopelícula puede ser sólo DNA. Recientemente, se ha demostrado que el DNA extracelular (DNAe) desempeña un papel importante en la estabilidad estructural, adaptación y supervivencia de la biopelícula [Barnes 2012] y es una fuente potencial para la transferencia de genes que influyen en la virulencia y resistencia a antibióticos u otras sustancias [Roberts 2010].

El DNAe se libera en la matriz a través de la autólisis de una pequeña población de células bacterianas, proporcionando de esta forma una abundante reserva de genes extracelulares [Mohammadi 2013]. Estos genes pueden derivarse de mutación y recombinación, de la adquisición de nuevo material genético (DNAe)

o de la expresión regulada del material genético existente [Jefferson 2004]. Si el DNAe se observa en la fase logarítmica de crecimiento puede deberse sobre todo a los mecanismos de secreción activa y no a la muerte celular. Si se observa una alta concentración de DNAe en etapas de crecimiento posteriores (después de 48h) se pueden atribuir a la lisis celular, la cual da lugar a la liberación pasiva de DNAe en el medio [Whitchurch 2002; Qin 2007; Thomas 2009].

Al proceso por el cual una bacteria receptora incorpora el DNAe se conoce como transformación. Solo determinadas especies se pueden transformar y se dice que una bacteria es competente, cuando es capaz de aceptar DNAe para ser transformada y esta capacidad a su vez está determinada genéticamente. Las bacterias competentes unen mucho más DNAe (mil veces más) que las no competentes [Madigan 2009].

El DNAe transformante se une a la superficie celular mediante una proteína de unión de DNA, de acuerdo a la bacteria, se introduce el fragmento bicatenario completo o por medio de una nucleasa se degrada una cadena y solo se introduce la que queda; en el primer caso el DNAe se integra en el genoma del receptor por recombinación y si se integra DNA monocatenario se forma un DNA heterodúplex y durante el siguiente ciclo de replicación del cromosoma se genera una molécula de DNA progenitora y una recombinante, esta molécula recombinante estará solo presente en la bacteria transformada y no en la progenitora. Las bacterias solo incorpora unos pocos fragmentos del DNAe, de modo que solo una pequeña proporción de los genes de una bacteria se pueden transferir a otra [Madigan 2009].

Otros medios por los cuales existe un intercambio de material genético dentro de una biopelícula bacteriana son por plásmidos (ácido desoxirribonucleico extracromosómico), enzimas y otras moléculas [Lasa 2005]. Se ha observado que cepas bacterianas de importancia clínica unidas a plásmidos desarrollan biopelículas

más fácilmente y que cepas portadoras de plásmidos transfieren éstos a bacterias receptoras. Sin plásmidos asociados, estos mismos microorganismos pueden producir microcolonias con escaso desarrollo. [Donlan 2002].

1.5. Biopelículas bacterianas

La cavidad bucal con sus diversos nichos ecológicos y variedad de nutrientes es, sin duda, propicio para la formación de biopelículas bacterianas [Dewhirst 2010; Jenkinson 2005]. Pueden desarrollarse sobre hueso, cemento, dentina, prótesis e implantes dentales, materiales de obturación intrarradicular y en la superficie dental como placa dentobacteriana [Donlan 2002].

La placa dentobacteriana, es el principal agente etiológico de las patologías orales más frecuentes, caries y enfermedad periodontal. La placa dentobacteriana es una comunidad microbiana compleja que se encuentra en la superficie dental embebida en una matriz de origen bacteriano y salival [Marsh 2011]. Para que las bacterias orales puedan adherirse a la superficie dental, se requiere de una película delgada amorfa que oscila entre 0.1 y 1.0 micrómetros de espesor definida como película adquirida que está compuesta por proteínas y glucoproteínas unidas a la hidroxiapatita del esmalte; estas proteínas y glucoproteínas provienen de elementos salivales y del fluido crevicular, así como de desechos bacterianos y celulares de los tejidos. También posee moléculas que funcionan como sitios de unión para la adherencia de microorganismos como las proteínas ricas en prolina (PRPs), lizosimas, amilasas y peroxidasas que favorecen la colonización bacteriana sobre la película adquirida. La formación de la placa dentobacteriana es el resultado de una serie de procesos complejos que involucran una variedad de bacterias y componentes de la cavidad bucal del hospedero [Carranza 2010; Liébana 2002].

La placa dentobacteriana se clasifica según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente, y por su potencial

patógeno en cariogénica y periodontopatogénica. La placa dentobacteriana supragingival se encuentra en las superficies dentales y está constituida predominantemente por flora bacteriana sacarolítica Gram positiva, en la que se encuentran microorganismos cariogénicos. La placa dentobacteriana subgingival se encuentra por completo dentro del surco gingival o en la bolsa periodontal y está constituida principalmente por flora bacteriana proteolítica Gram negativa, en la cual se encuentran los microorganismos periodontopatogénicos. **[Carranza Newman, 2010; Slots 1992; Genco 1993]**.

Como se mencionó anteriormente, la placa dentobacteriana se clasifica de acuerdo con su potencial patógeno como cariogénica y periodontopatogénica, las cuales se describirán a continuación.

Placa dentobacteriana cariogénica

Las bacterias que conforman la biopelícula son siempre metabólicamente activas, dentro de la placa dentobacteriana pueden encontrarse bacterias potencialmente cariogénicas que pueden provocar cambios en el pH y la disolución de los tejidos dentales duros (esmalte y dentina) **[Kidd 2004; Kolenbrander 2002]**. En un pH neutro estos organismos son débilmente competitivos encontrándose sólo en una proporción muy pequeña y con una dieta baja en carbohidratos se establece un equilibrio en el proceso de desmineralización-rem mineralización, por el contrario, si se incrementa la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentables, el pH baja (pH 5.5) lo cual altera la ecología microbiana de la placa. Un pH bajo favorece la proliferación de bacterias acidúricas y acidogénicas, llevando a un proceso de desmineralización y el establecimiento de la caries dental **[Marsh 1994]**.

Dentro del complejo bucal, solo un pequeño grupo de bacterias (*S. mutans* y *Actinomyces* sp.) tienen menor capacidad para adherirse a la superficie dental, por lo que el acondicionamiento de la superficie a partir de los colonizadores primarios

(*Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces* sp.) es fundamental para su crecimiento. Los exopolisacáridos (EPS) formados en las superficies microbianas mejoran las interacciones adhesivas de *S. mutans* y aumentan la cohesión de otros microorganismos [Cross 2007; Gregoire 2011]. La película adquirida y los EPS formados por las interacciones entre sacarosa y *S. mutans*, también proporcionan sitios de unión para los microorganismos cariogénicos y otros, como se puede observar en la (Fig. 4) [Siqueira 2012].

S. mutans produce estos EPS por medio de exoenzimas como la glucosiltransferasa (GTFS) [Bowen 2011]. Aunque existen numerosas especies microbianas en la biopelícula, la mayoría de ellas no contribuyen a la síntesis de EPS únicamente hasta que estén recubiertas por GTFS, ya que la GTFS puede inducir su producción sobre especies no productoras, siendo así *S. mutans* la principal fuente de GTFS [Klein 2013].

Cuando el pH del ambiente baja, la diversidad microbiana es reducida drásticamente en favor a los microorganismos acidúricos y acidogénicos [Gross 2012]. Muchos microorganismos incluidos en la biopelícula son igualmente o más ácido-productores y ácido-tolerantes, incluyendo otros estreptococos como *Streptococcus vestibularis* y *Streptococcus salivarius*; *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium dentium*, *Candida* sp. y *Scardovia* sp. [Aas 2008; Palmer 2010; Takahashi 2011].

La saliva es capaz de neutralizar los ácidos producidos en la boca, sin embargo, los EPS y otros materiales de la matriz pueden restringir el acceso de la saliva al afectar la difusión de sustancias dentro y fuera de la biopelícula [Flemming 2010].

La actividad metabólica de los microorganismos y la producción de ácido por sí sola no puede ser el factor determinante de la virulencia, sino más bien de cómo y

dónde se forman los microambientes ácidos, que están mantenidos y protegidos dentro de la estructura de la biopelícula. Las bacterias acidogénicas-acidúricas pueden producir grandes cantidades de ácidos localmente y la caries dental se caracteriza por la aparición de regiones definidas de desmineralización en el esmalte de los dientes, la distribución localizada de nichos ácidos dentro de la biopelícula y la concentración elevada de ácido cerca de la superficie, explica el patrón de aparición de la lesión primaria hasta el establecimiento de una cavidad cariosa [Koo 2013].

Placa dentobacteriana periodontopatogénica

Como se mencionó anteriormente, una vez que se forma la película adquirida sobre la superficie dental, ésta es colonizada por las bacterias que residen en la cavidad bucal, ver (Fig. 5). Algunos mecanismos por los cuales las bacterias se pueden adherir a la película adquirida son: mediante moléculas específicas denominadas "adhesinas" presentes en la superficie bacteriana las cuales se unen posteriormente con receptores específicos de la película adquirida, a través de estructuras proteínicas fibrosas llamadas "fimbrias" que se fijan a la película adquirida, por la formación de puentes de calcio (Ca^{++}) y magnesio (Mg^{++}) con carga positiva que permiten la unión de componentes bacterianos cargados negativamente a la película que también posee carga negativa, y a través de polisacáridos extracelulares sintetizados a partir de la sacarosa que permiten la unión de polisacáridos bacterianos a la superficie de la película [Wright 2013].

Los primeros colonizadores son cocos y bacilos Gram positivos, *S. sanguinis* es el primer microorganismo que se adhiere a la superficie de la película adquirida y como tal, inicia la colonización microbiana para la formación de la placa dentobacteriana supragingival e inmediatamente se adhiere *Actinomyces viscosus* [Marsh 2000]. La asociación de estas bacterias con la superficie dental es muy importante para la colonización posterior de las diferentes especies bacterianas

[Kamma 1995; Petsios 1995]. Otras bacterias que inician el proceso de colonización son *Streptococcus* del grupo oralis (*S. oralis*, *Streptococcus mitis*), *Actinomyces* sp., *Neisserias* sp., *Haemophilus* sp., *Granulicatella adiacens*, *Abiotrophia defectiva*, *Gemella* sp. y *Rothia* sp. [Jenkinson 2011].

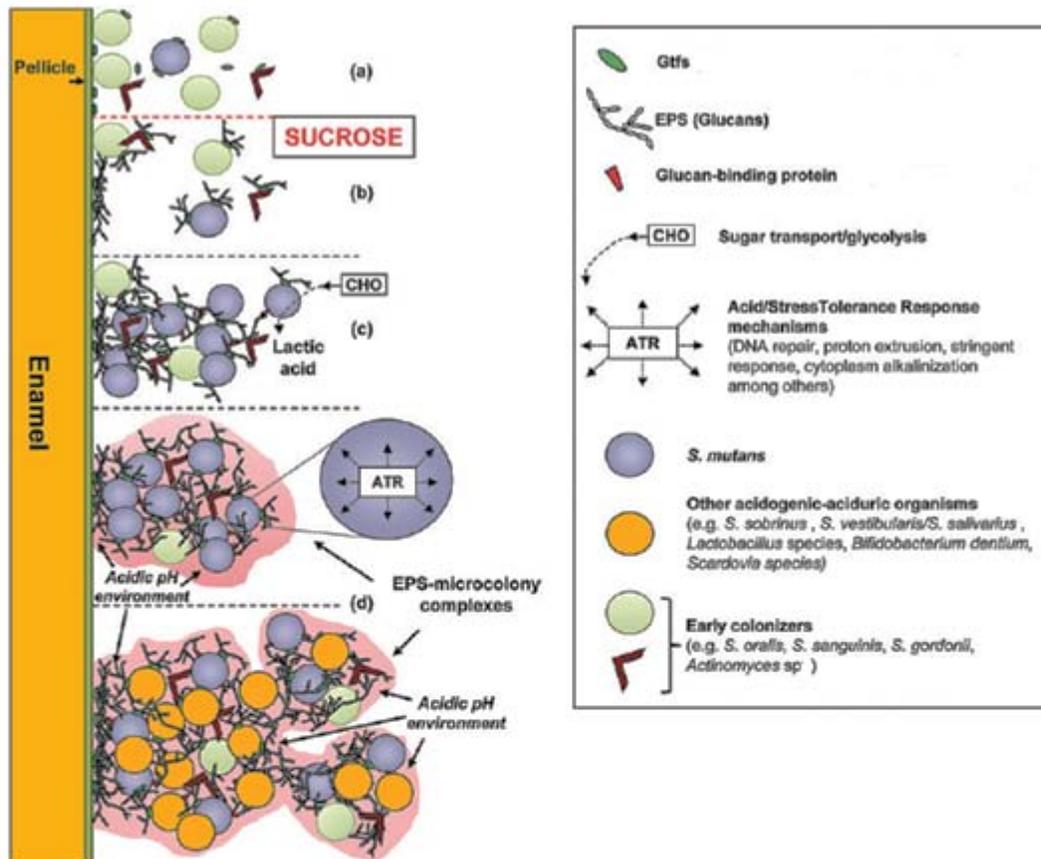


Figura 4. Se representa el ensamblaje secuencial de la matriz de la biopelícula cariogénica. (a) Las enzimas GTFS secretadas por *S. mutans* se incorporan a la película adquirida y / o se adsorben a las superficies bacterianas, incluso de los microorganismos que no producen GTFS (por ejemplo, *Actinomyces* sp.). (b) Las GTFS que se adsorben a las superficies dentro de la cavidad bucal, pueden utilizar rápidamente la sacarosa que obtienen de la dieta y como resultado, se producen glucanos insolubles y solubles. (c) Las moléculas de glucano formadas en la superficie proporcionan sitios de unión para varios microorganismos residentes y especialmente para *S. mutans*, que media la agrupación bacteriana y la adhesión al esmalte. Además, las bacterias recubiertas por los GTFS se convierten en productores de glucano, para que puedan unirse a la superficie dental y microbiana por mecanismos similares a los utilizados por *S. mutans*. Al mismo tiempo, carbohidratos de la dieta se metabolizan en ácidos por microorganismos acidogénicos / acidúricos. (d) Una vez que se han establecido en la matriz de EPS, la biopelícula por medio de cambios ambientales (por ejemplo, el pH y la disponibilidad de nutrientes) decidirá qué y cómo las bacterias sobrevivirán, facilitando el predominio de ciertas especies dentro de la biopelícula, es decir, especies cariogénicas. El entorno con un pH bajo promueve la desmineralización del esmalte.

Los colonizadores secundarios, también llamados colonizadores puente y tardíos, poseen mecanismos de adhesión tanto con los primeros colonizadores como con las especies que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana. Este grupo de microorganismos está formado principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter* sp., *Capnocytophaga* sp., *Veillonella* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia*, entre otros **[Kolenbrander 1999]**.

Después de siete días de formada la placa dentobacteriana, las especies de *Streptococcus* continúan siendo el grupo predominante, pero a las dos semanas comienzan a predominar los bacilos anaerobios y las formas filamentosas. Estos cambios microbianos que se van produciendo van ligados a diversas causas, tales como antagonismo por competencia de sustratos, producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por el consumo de oxígeno en el ambiente por lo que ocurre una sustitución de especies bacterianas Gram positivas facultativas por especies bacterianas Gram negativas anaerobias facultativas y estrictas, proceso llamado Sucesión autogénica **[Carranza 2010; Liébana 2002]**. Finalmente, si la secuencia de colonización de la placa dentobacteriana no se ve interrumpida, otro grupo de microorganismos se unirá y son considerados los colonizadores más patógenos estos son: *F. nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*, que están estrechamente asociados con el desarrollo de la periodontitis **[Haffajee 1994; Kuboniwa 2010; Perisasamy 2010; van Winkelhoff 2002; He 2012]**.

Se han descrito coagregaciones entre *S. sanguinis* con *A. viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Corynebacterium matruchotii* y *F. nucleatum*, *P. loescheii* con *A. viscosus* y *Capnocytophaga ochracea* con *A. viscosus*. También entre especies Gram positivas como *S. gordonii*, *S. mitis* con *C. matruchotii* o con *Propionibacterium acnes*; entre especies Gram positivas con Gram negativas como

Streptococcus sp. o *Actinomyces* sp. con *Prevotella* sp. y *Porphyromonas* sp., *Capnocytophaga* sp., *F. nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella* sp.; y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *F. nucleatum* [Carranza 2010; Liébana 2002].

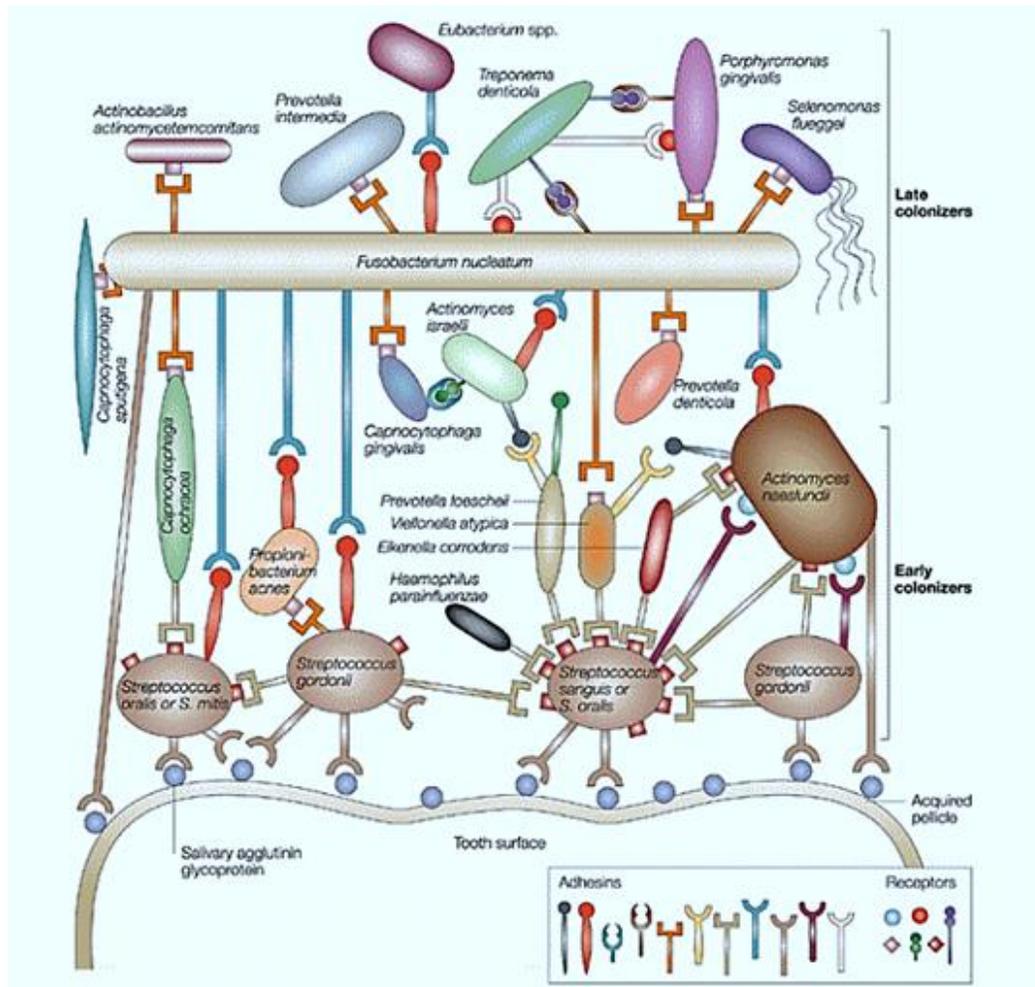


Figura 5. Esquema del patrón de colonización para la formación de la biopelícula dentobacteriana periodontopatogénica. La colonización bacteriana se inicia con la formación de una película de proteínas salivales (albúmina, glicoproteínas, proteínas ricas en prolina, mucina, etc.) en el esmalte dental, en la cual, se adhieren los colonizadores primarios, bacilos y cocos Gram positivos, incluyendo *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* y *A. viscosus*. Después de los colonizadores primarios se adhieren y se multiplican, *Fusobacterium nucleatum* que actúa como un puente para la coagregación de otras especies microbianas, llamados colonizadoras tardíos o secundarios. A medida que aumenta la placa de espesor, la concentración de oxígeno en las zonas más profundas se reduce y las bacterias aeróbicas comienzan a desaparecer de esta área, para ser reemplazados por otros, cuyo potencial redox es menor (anaerobios facultativos y estrictos). Por lo tanto, los microorganismos aeróbicos se encuentran en las zonas más superficiales de la biopelícula y las especies anaeróbicas estrictas o menos aerotolerantes se encuentran en las zonas más profundas, únicamente encontraremos a los estreptococos en cualquier lugar de la placa dentobacteriana.

En las últimas fases de la formación de la placa, es probable que predomine la coagregación entre especies Gram negativas anaerobias, como *F. nucleatum* con *P. gingivalis* [Sundqvist 1993]. Este fenómeno provee las condiciones para la interacción patogénica característica de las infecciones periodontales, ver (Fig. 6).

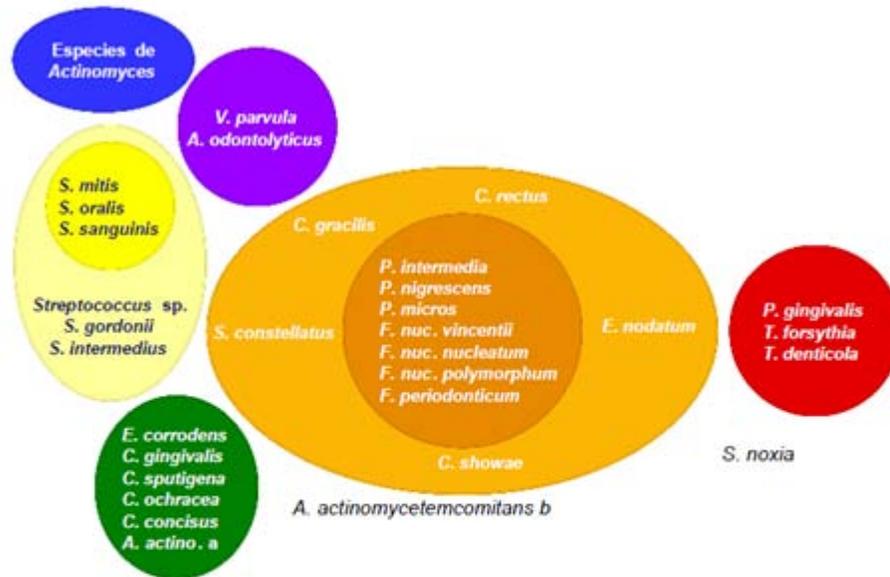


Figura 6. Representación de las asociaciones entre especies bacterianas por Socransky y Haffajee (1998), que forman la placa dentobacteriana. Los complejos amarillo, morado, verde y azul son especies consideradas como “colonizadoras primarias”, estos complejos conforman la placa supragingival. El complejo naranja está compuesto principalmente por “colonizadores puente” y el complejo rojo por “colonizadores tardíos”, estos dos complejos se observan principalmente en la placa subgingival. Especies no agrupadas: *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* y *Actinomyces viscosus*.

1.6. Biopelículas fúngicas

La formación de una biopelícula por cualquier microorganismo sigue una secuencia de desarrollo similar y los hongos no son la excepción. La capacidad que tienen algunos hongos para colonizar una superficie y formar biopelículas contribuye a la prevalencia de estos microorganismos como agentes etiológicos de infecciones persistentes [Castrillón 2013]. En la cavidad bucal, por ejemplo, encontramos que *C. albicans* es el agente etiológico de la candidiasis bucal y está

presente en las infecciones periapicales crónicas y persistentes después del tratamiento de conductos radiculares.

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras y los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos formando largos filamentos denominados hifas que con frecuencia se ramifican. Algunos hongos son dimórficos, es decir, tienen la capacidad de transformarse de una forma a otra, como *C. albicans* [Prats 2005]. Por lo tanto, la formación de la biopelícula será diferente de acuerdo a la forma en que se encuentre un hongo.

Las etapas de desarrollo de la biopelícula fúngica por levaduras (por ejemplo, *C. albicans*) son:

- Etapa 1: Acondicionamiento y adhesión de las levaduras a la superficie. La adhesión se ve favorecida por diversos factores como el flujo del medio que las rodea (saliva, sangre, etc.), el pH, la temperatura, entre otros.
- Etapa 2: Proliferación de las células de levadura y síntesis de la matriz extracelular inducida por Quorum sensing. La formación de la matriz extracelular favorece la adhesión celular y proporciona a la célula protección contra las células del sistema inmune del huésped y a los antifúngicos [Soll 2009].
- Etapa 3: Formación de hifas en la parte superior de la biopelícula. Ciertos hongos como *C. albicans* responden a una variedad de señales ambientales y celulares que influyen en su morfogénesis, una de estas señales es la detección de contactos, en donde las levaduras al tener contacto con la superficie cambian a un crecimiento como hifa [Kumamoto 2008]. Las hifas crecen por extensión apical, tabicándose para formar nuevas células que no

se desprenden y se van ramificando hasta formar un conjunto entrelazado de hifas que se denomina micelio [Prats 2005].

- Etapa 4: Maduración de la biopelícula. La biopelícula madura consiste en una densa red de levaduras, pseudohifas (se forman cuando las células hijas no logran separarse) e hifas cubiertas por una matriz extracelular y frecuentemente asociadas con bacterias [Berman 2002].
- Etapa 5: Dispersión de las células de levadura. La dispersión de células de levadura contribuyen directamente a la virulencia [Castrillón 2010; Finkel 2011].

La formación de biopelículas en hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus* sp.) se da de manera distinta, como se puede observar en la (Fig. 7), ocurre en 6 fases [Harding 2009]:

- Fase 1: Adsorción de propágulos. Un propágulo es una estructura del hongo que se produce de manera sexual o asexualmente, capaz de desarrollarse de manera separada para dar lugar a un nuevo organismo idéntico al que le formó.
- Fase 2: Unión activa a la superficie. Los hongos filamentosos secretan proteínas llamadas hidrofobinas (exclusivas de este tipo de hongos) que participan en la formación de estructuras aéreas, en la unión de la hifa a superficies hidrofóbicas y en la formación de biopelículas [Sudbery 2004].
- Fase 3: Formación de colonias I. Hay un crecimiento, colonización de hongos y ramificación de hifas a través de la superficie, como una monocapa de células de hifas y producción de matriz extracelular.
- Fase 4: Formación de colonias II. Formación de redes de hifas (micelio), adhesión hifa-hifa y formación de canales de agua.
- Fase 5: Maduración y desarrollo reproductivo. Formación de cuerpos fructíferos, células esporógenas y otras estructuras de supervivencia.

- Fase 6: Dispersión de esporas o liberación de fragmentos de biopelícula para reiniciar el ciclo.

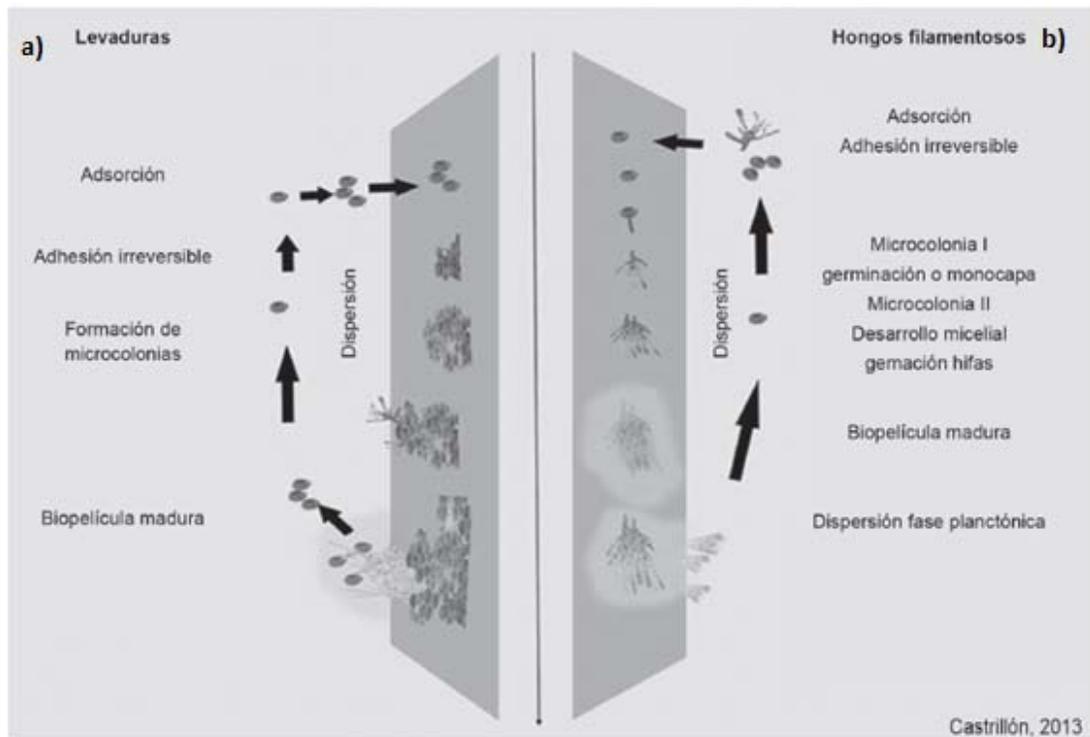


Figura 7. Fases de desarrollo de las biopelículas fúngicas. a) Las etapas de desarrollo de la biopelícula fúngica por levaduras son: Adsorción de las células de levadura y acondicionamiento de la superficie; adhesión a la superficie; proliferación de las células de levadura y síntesis de la matriz extracelular (formación de microcolonias); maduración de la biopelícula y dispersión de las células de levadura. b) Las etapas de la formación de biopelículas por hongos filamentosos son: Adsorción de propágulos; adhesión a la superficie; formación de colonias I, donde hay crecimiento y colonización de hongos y ramificación de hifas a través de la superficie; formación de colonias II, que involucra la formación de redes de hifas; maduración y desarrollo reproductivo y dispersión de esporas o liberación de fragmentos de biopelícula para reiniciar el ciclo.

Formación de biopelícula por *C. albicans*.

C. albicans es un miembro del microbioma humano normal, que bajo ciertas circunstancias, puede causar infecciones. Cuenta con varios mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia (que se describirán con más detalle en el capítulo 2), la formación de biopelículas es uno de estos mecanismos, considerándose por esta razón la especie de *Candida* más patógena [Nicholls 2011]. La formación de biopelícula por *C. albicans* sigue un proceso que se inicia cuando las levaduras se adhieren a la superficie, continuando con la proliferación, maduración

y dispersión de las células (como se describió anteriormente). De acuerdo al tiempo de formación se divide en: etapa temprana (8-11 horas), etapa intermedia (12-30 horas) y etapa madura (38-72 horas), como se muestra en la **(Fig. 8) [Castrillón 2013]**.

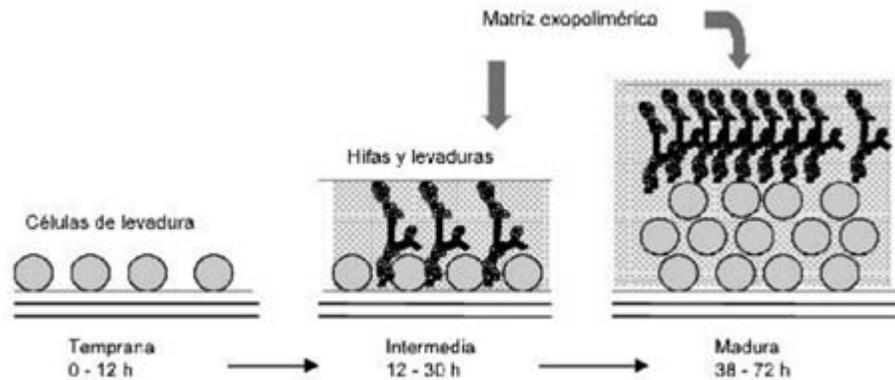


Figura 8. La formación de biopelícula por *C. albicans* sigue un proceso que se inicia cuando las levaduras se adhieren a la superficie, continuando con la proliferación, maduración y dispersión de las células. De acuerdo al tiempo de formación de la biopelícula se divide en: etapa temprana (8-11 horas), etapa intermedia (12-30 horas) y etapa madura (38-72 horas)

C. albicans tiene un conjunto especializado de proteínas denominadas adhesinas, que median la adhesión a la superficie y a otros microorganismos [Verstrepen 2006; Garcia 2011], como: las proteínas que forman la secuencia-aglutinina (ALS) compuesta por Als1-7 y Als9, estas proteínas codifican el gen glicosilfosfatidilinositol (GPI) vinculada a glicoproteínas de la superficie celular y especialmente ALS3 es importante para la adhesión [Zordan 2012; Phan 2007; Murciano 2012]. Otra adhesina importante de *C. albicans* es Hwp1, que es una proteína de la pared hifal [Zordan 2012; Staab 1999; Sundstrom 2002]. Hwp1 y ALS3 contribuyen a la formación de la biopelícula [Nobile 2008].

La producción de la matriz extracelular que compone la biopelícula está controlada por las glucoamilasas (Gca1 y Gca2), glucanotransferasas (Bgl2 y PHR1) y la exoglucanasa (Xog1), participando en la producción de β -1,3 glucano, que es el principal componente de la matriz [Nobile 2009; Taff 2012]. Los estudios que se

han realizado sugieren que los β -glucanos brindan una importante protección a *C. albicans* ante los cambios del medio [Xie 2012]. La producción de matriz extracelular esencial para la maduración de la biopelícula [Cortés 2011]. En la última etapa de desarrollo de la biopelícula, las células en forma de levadura al ser pequeñas facilitan la diseminación de *C. albicans* [Saville 2003].

Por último, las biopelículas están conformadas por múltiples microorganismos y *C. albicans* puede formar parte de una biopelícula bacteriana. Se ha observado que una gama de moléculas de señalización producidas por las bacterias pueden afectar la formación de biopelículas y la morfogénesis de *C. albicans* pueden ser el ácido láctico, H_2O_2 , dióxido de carbono (CO_2) y peptidoglicanos bacterianos, los cuales parecen promover la filamentación, mientras que, HSLs inhibe la filamentación [Xu 2008; Hall 2011]. De igual manera, los ácidos grasos, ácidos carboxílicos y glicanos producidos por *C. albicans* son capaces de promover el crecimiento de las bacterias, mientras que el farnesol producido por *C. albicans* inhibe la formación de biopelículas bacterianas [Pammi 2011].

Se puede concluir que la filamentación de *C. albicans* y las especies mixtas bacterianas que conforman una biopelícula están regulados por el reconocimiento de un complejo conjunto de moléculas propias o no propias de señalización. También se ha encontrado que la coagregación de *C. albicans* con algunas bacterias orales es crucial para su colonización y persistencia [Brogden 2008].

En la (Fig. 9) se muestra un ejemplo de interacción entre *C. albicans* y *Streptococcus* sp. [Wright 2013]. Además de proporcionar sitios de adhesión, los estreptococos secretan lactato que puede actuar como una fuente de carbono para el crecimiento de la levadura de *C. albicans* y esta a su vez reduce la tensión de oxígeno a niveles adecuados para los estreptococos y proporciona factores estimulantes de crecimiento para las bacterias [Brogden 2008]. Por el contrario, se ha visto que *C.*

albicans presenta una disminución en su crecimiento y formación de la biopelícula cuando *Pseudomonas aeruginosa* se cocultiva con esta [Wright 2013].

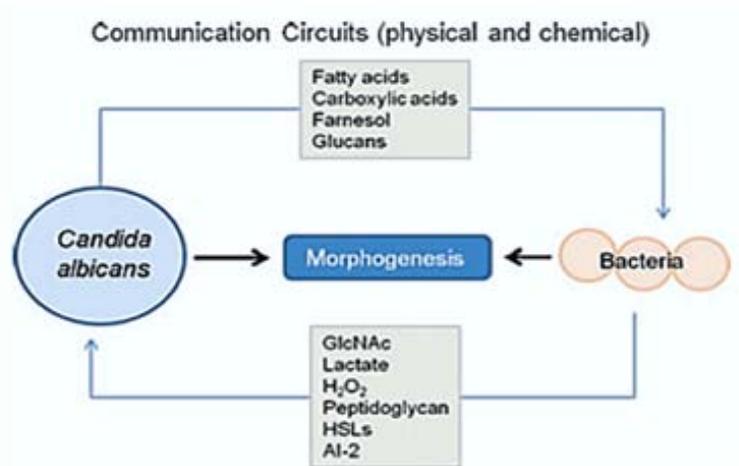


Figura 9. Comunicación entre *Candida albicans* y *Streptococos* orales. El diagrama muestra la transición de la levadura a hifa por los productos bacterianos que pueden afectar diversamente en la morfogénesis y la formación de biopelículas; a su vez, los productos de *C. albicans* que pueden influir positiva o negativamente en el crecimiento bacteriano y formación de biopelícula. Estos productos pueden ser el ácido láctico, H_2O_2 , CO_2 y peptidoglicanos bacterianos, los cuales parecen promover la filamentación, mientras que, HSLs inhiben la filamentación. De igual manera, los ácidos grasos, ácidos carboxílicos y glicanos producidos por *C. albicans* son capaces de promover el crecimiento de las bacterias, mientras que el farnesol producido por *C. albicans* inhibe la formación de biopelículas bacterianas.

2. Microbiota endodóntica y formación de biopelícula intraconducto

2.1. Infección pulpar

En la cavidad bucal se han identificado más de 700 especies de bacterias, de las cuales un individuo puede albergar 100-200 de estas especies. En condiciones normales, la pulpa dental y la dentina son tejidos estériles que se encuentran aislados de los microorganismos orales por medio del esmalte y el cemento, que son las estructuras que los recubren. De esta manera los tejidos duros, esmalte y dentina que conforman la estructura dental, actúan como una barrera física que evita la invasión de estos microorganismos comensales hacia el tejido pulpar, pero cuando ésta barrera pierde su integridad queda expuesto al medio bucal corriendo el riesgo de ser infectado por estos microorganismos. Una vez que los microorganismos colonizan el tejido pulpar pueden ocasionar inflamación y necrosis pulpar, así como posterior daño a los tejidos periapicales [Kakehashi 1965; Sundqvist 2003; Walton 2010].

Los principales factores etiológicos de la inflamación pulpar son la invasión microbiana que se puede dar por medio de distintas vías de infección y los factores de virulencia derivados de los microorganismos presentes [Trowbridge 2002].

2.1.1. Vías de infección pulpar

Existen diversas vías de infección que permiten una comunicación entre el medio bucal y el tejido pulpar, los microorganismos pueden llegar hacia la cavidad pulpar a través de las siguientes vías (Fig. 10) [Bammann 2009; Sundqvist 2003]:

- Túbulos dentinarios: Después de una lesión por caries o durante algunos procedimientos dentales, los microorganismos pueden utilizar esta vía para llegar al tejido pulpar. Los microorganismos pueden tener acceso al tejido

pulpar cuando la distancia entre la dentina con caries y la cavidad pulpar es de 0.2 mm **[Dahlen 1991]**.

- Comunicación directa: La exposición directa de la pulpa por traumatismo, fractura coronaria o por maniobras operatorias (iatrogenia), rompe la barrera física impuesta por la estructura dental y el tejido pulpar entra en contacto con el ambiente bucal séptico.
- Vía periodontal: Los microorganismos del surco gingival pueden llegar al tejido pulpar a través del ligamento periodontal, por medio de un conducto lateral o por el foramen apical. Esta vía se vuelve disponible para los microorganismos durante una profilaxis dental, luxación dentaria y más significativamente, como resultado de la migración del epitelio de inserción para el establecimiento de las bolsas periodontales.
- Anacoresis: Los microorganismos circulantes en la sangre o linfa pueden ser atraídos hacia el tejido pulpar inflamado, colonizarlo y producir una infección. Estos microorganismos pueden ser atraídos después de un traumatismo, de un procedimiento periodontal o después de una intervención quirúrgica que produce la inflamación sin causar exposición pulpar. Esta vía puede explicar la presencia de infección microbiana en dientes intactos con historia de trauma **[Cohen 2011]**.
- Restauración inadecuada: Se produce a través de la interfase existente entre el material de restauración y el diente (filtración marginal). Se presenta por errores en la técnica operatoria como adaptaciones inadecuadas de los márgenes de la corona a la línea de terminación de tallado, en la obturación del conducto radicular y en colocación de restauraciones temporales.
- Extensión: Los microorganismos de un diente infectado pueden migrar a uno con tejido pulpar sano, a través de la difusión puede alcanzar el conducto principal y/o los conductos laterales del diente adyacente. También una

lesión periapical que pueda afectar el paquete vasculo-nervioso del diente vecino y provocar la necrosis pulpar [Narayanan 2010].

Una vez que las barreras de protección del huésped son alteradas o destruidas por los microorganismos inicia el proceso inflamatorio.

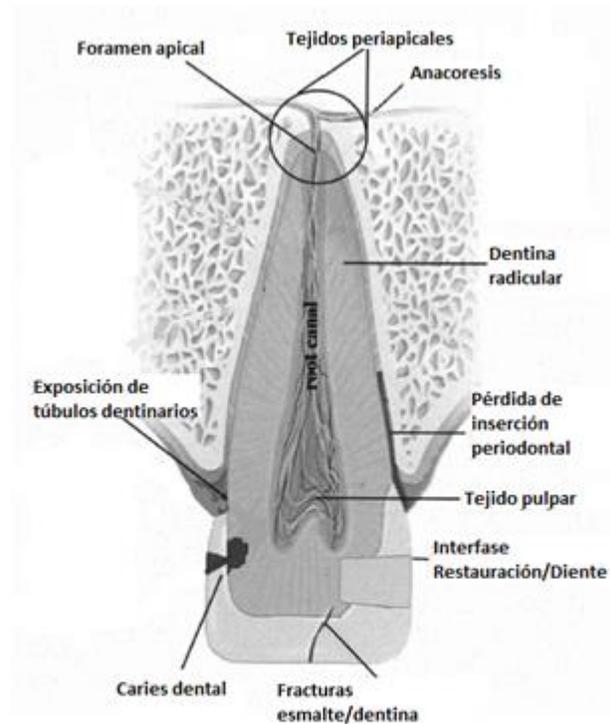


Figura 10. Se muestran las diversas vías de infección que permiten una comunicación entre el medio bucal y el tejido pulpar, estas son: túbulos dentinarios, comunicación directa por caries, vía periodontal, anacoresis, restauración inadecuada y extensión.

2.1.2. Clasificación de las infecciones pulpares

Las infecciones pulpares de acuerdo a los hallazgos subjetivos y objetivos clínicos se clasifican en [Cohen 2011; Walton 2010]:

- Pulpitis reversible: Se presenta una inflamación leve del tejido pulpar. Entre los factores etiológicos están la caries dental, la dentina expuesta, los

tratamientos dentales y las restauraciones defectuosas. Al eliminarse la causa, la inflamación remite y la pulpa vuelve a su estado de salud.

- Pulpitis irreversible: Se presenta una inflamación grave del tejido pulpar. Suele ser una consecuencia de la progresión de una pulpitis reversible, que no remite aunque se elimine la causa y es necesario realizar un tratamiento para retirar el tejido enfermo. Otras causas son restauraciones profundas y exposición pulpar.
- Necrosis pulpar: Como resultado de la pulpitis irreversible, se presenta la muerte del tejido pulpar parcial o total, afectando lenta o rápidamente todo el sistema de conductos radiculares. La vascularización pulpar es inexistente y la inervación pulpar ya no es funcional.

2.1.3. Factores de virulencia microbianos

A la capacidad que tiene un microorganismo para causar enfermedad o daño al huésped se le denomina patogenicidad, la patogenicidad está relacionada con la producción de toxinas, enzimas y ciertas propiedades con las que cuentan los microorganismos que les permite causar alteraciones morfológicas y fisiológicas en los tejidos del huésped, a estas propiedades se le conoce como factores de virulencia. La patogenicidad de los microorganismos y su capacidad para multiplicarse es más importante que su cantidad. De tal manera que, los microorganismos con una alta tasa metabólica tienen mayor capacidad para producir y liberar endotoxinas, exotoxinas, exoenzimas y metabolitos microbianos, lo que los hace más patogénicos **[Narayanan 2010]**.

Diversos mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia están disponibles para modular la participación de los microorganismos en las interacciones huésped-bacteria o huésped-hongo. El principal mecanismo de patogenicidad con el que cuentan la mayoría de los microorganismos es la capacidad de formar agregados y formar biopelículas (se describió en el capítulo 1). Estos mecanismos y factores, así

como la capacidad defensiva del huésped determinarían la gravedad de la inflamación pulpar **[Liébana 2002]**.

Los factores de virulencia de las bacterias son:

- Peptidoglicano (PG): Es el componente principal de la pared celular de las bacterias Gram positivas, las Gram negativas lo contienen en menor cantidad. Tras la lisis celular, es liberado y puede reaccionar con el sistema inmune innato, así como inducir la regulación de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios en las células T **[Wang 2000]**. También puede facilitar una respuesta adaptativa inmune a través de los macrófagos **[Myhre 2006]**. El PG se potencia en presencia de LPS **[Wang 2001]**.
- Uniones mediadas por ácido lipoteicoico (ALT): Es un componente de la pared celular de las bacterias Gram positivas, está compuesto de ácido teicoico y lípidos. Comparte muchas de las propiedades patógenas con LPS **[Cohen 2001]**. Se libera como resultado de la lisis celular y se une a las células diana, interactúa con anticuerpos circulantes, activa la cascada del complemento y como resultado causan daño a los tejidos.
- Lipopolisacáridos (LPS): Es una endotoxina que forma parte integral de la pared celular de las bacterias Gram negativas y es su principal factor de patogenicidad. Se liberan tras la lisis celular y tienen numerosos efectos biológicos: amplifica la reacción inflamatoria pulpar y periapical, activa el sistema de complemento, estimula la liberación de mediadores proinflamatorios como la interleucina 1 (IL-1), se asocian con el dolor pulpar y es un mediador importante en la inflamación y destrucción ósea periapical **[Horiba 1992; Khabbaz 2001; Jacinto 2005; Rietschel 1992; Nair 2004]**.
- Fimbrias: Son macromoléculas filamentosas que se encuentran en la superficie de muchas bacterias Gram negativas. Están implicadas en la unión a las superficies y las interacciones con otras bacterias, ya que en el extremo

de las fimbrias se encuentran unas moléculas denominadas adhesinas que interactúan con el receptor proteico o polisacárido, situado en otra bacteria o en una superficie tisular [Tang 2004].

- Vesículas extracelulares: Son producidas por bacterias Gram negativas y permiten la liberación de sus productos en el medio ambiente extracelular. Contienen proteínas y lípidos que están implicados en una amplia gama de actividades incluyendo la hemaglutinación, la hemólisis, la adhesión bacteriana y las actividades proteolíticas [Kinder 1989]. Son un medio por el cual las bacterias interactúan con las células procarióticas y eucarióticas y pueden modular las interacciones entre las bacterias vecinas [Beveridge 1999; Kuehn 2005].
- Cápsula: Es una capa organizada fuera de la pared celular de las bacterias, compuesta de polisacáridos y otros materiales. Sirven como protección de la célula bacteriana contra la desecación, la fagocitosis, virus bacterianos (bacteriófagos) y materiales tóxicos hidrófobos tales como detergentes. Las bacterias y los hongos utilizan formación de la cápsula para inhibir la activación del complemento y resistir la ingestión por los fagocitos. Las bacterias con cápsula son más virulentas que las que no tienen.
- Exotoxinas: Son proteínas solubles y difusibles de bajo peso molecular producidas tanto por bacterias Gram positivas como por bacterias Gram negativas y presentan un poder inmunógeno elevado. Son liberadas por una célula viva y pueden desencadenar la activación excesiva y aberrante de las células T [Llewelyn 2002]. Estas toxinas bacterianas también pueden dirigirse a otros microorganismos, por ejemplo, las bacteriocinas que son bacteriostáticos o bactericidas para otras bacterias [Tomita 1997].
- Proteínas extracelulares: Estas proteínas son enzimas que producen las bacterias que se liberan durante la lisis de la célula bacteriana, contribuyendo a la propagación de la infección. Incluyen proteasas que

neutralizan las inmunoglobulinas y componentes del complemento. Las enzimas como hialuronatoliasa, sulfatasa condroitina, beta glucuronidasa, DNasa y fosfatasa ácida contribuyen a la desintegración de los tejidos **[Sundqvist 1985]**.

- Ácidos grasos de cadena corta: Son los principales subproductos de la fermentación realizada por anaerobios obligados e incluyen el ácido butírico y propiónico. Estos ácidos estimulan la respuesta inflamatoria y la liberación de citocinas proinflamatorias que contribuyen al proceso de infección, como la IL-1 que se asocia con la reabsorción ósea y patología periapical **[Niederman 1997; Kurita-Ochiai 2006; Wang 1993]**.
- Poliaminas: Son pequeñas moléculas policatiónicas como la putrescina, cadaverina, espermidina y espermina que contribuyen a los síntomas clínicos como el dolor y formación de fístula. Actúan mediante la modulación de una variedad de canales iónicos **[Maita 1990]**.
- Aniones superóxido: Son radicales libres biológicamente tóxicos y altamente reactivos. Estos son producidos por algunas especies bacterianas y también por las células del sistema inmune. Causan la lisis de los eritrocitos y están involucrados en la interacción entre especies **[Falcioni 1981]**.

Otros mecanismo por el los cual las bacterias pueden modular el proceso de infección, es la capacidad que tienen algunas bacterias intracelulares para inactivar los mecanismos de eliminación de las células fagocíticas y de ese modo evitar ser asesinados por los macrófagos y neutrófilos **[Jansen 2006]**. También algunas bacterias pueden modificar genéticamente sus antígenos de superficie, lo que dificulta al sistema inmune el ataque a estos microorganismos **[Frank 2006]**.

Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia de *C. albicans*

Al igual que las bacterias, *C. albicans* cuentan con mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia que le permiten permanecer y tolerar los cambios del medio en el que se encuentra, de esta manera puede desempeñar un papel en la etiología de ciertas enfermedades orales. Estos son:

- Adaptabilidad a las condiciones ambientales: Tiene la capacidad para sobrevivir como comensal en diversos sitios anatómicos del cuerpo humano en donde las condiciones ambientales son específicas en cada uno de estos. Por ejemplo, es capaz de adaptarse al pH del medio, se han identificado proteínas importantes para la adaptación a los cambios de pH como las β -glicosidasas PHR1 (se expresa ante un pH neutro-alkalino) y PHR2 (se expresa ante un pH ácido), incluso es capaz de modular el pH extracelular (alcalinización) [**Fonzi 1999; Mühlischlegel 1997**].
- Adhesión a superficies: Las especies de *Candida* tienen adhesinas (se describieron en el Capítulo 1), que son moléculas de la superficie que median la adhesión a la superficie de los tejidos del huésped y permiten la coagregación con otros microorganismos. También son capaces de unirse al colágeno tipo I (dentina y pulpa) y IV (membrana basal) [**Siqueira 2004**].
- Producción de enzimas: *C. albicans* produce enzimas hidrolíticas que pueden estar implicados en el daño a los tejidos periapicales como aspartil proteinasa, colagenasa, aminopeptidasas, glucosaminidasas, fosfatasas ácida y alcalina, hialuronidasa y condroitinsulfatasa, todas estas degradan proteínas de la matriz extracelular [**Almeida 2008; Garcia 2011; Staib 2007**]. Otras enzimas que producen son la enzima colagenolítica que puede degradar el colágeno de la dentina [**Verstrepen 2006**] y las fosfolipasas que causan daño a la membrana celular de las células huésped, desestabilizan la membrana celular provocando la lisis [**Zordan 2012**].

- Transición morfológica: *C. albicans* es un hongo dimórfico, es decir, que se puede encontrar en forma de levadura (blastosporo) o hifa (filamentoso), dependiendo de las condiciones del medio ambiente [Phan 2007; Murciano 2012]. Una variedad de señales ambientales afectan su morfología, por ejemplo el pH bajo (<6) induce un crecimiento en forma de levadura, mientras que un pH alto (> 7) promueve el crecimiento de las hifas [Odds 1988].

En forma de hifa es más invasiva que en forma de levadura [Berman 2002]. El cambio de levadura a forma de hifa puede conferir la capacidad para poder escapar de la fagocitosis por los macrófagos [Wächtler 2011]. Sin embargo, aunque la transición levadura a hifa puede ser importante, no siempre es un requisito previo para que la infección pueda ocurrir [Pfaller 2007]. En la mayoría de las infecciones causadas por *C. albicans* se encuentra en ambas formas [Mayer 2013].

- Detección de contactos y tigmotropismo: Al entrar en contacto con una superficie, las células de levadura cambian a un crecimiento como hifa [Kumamoto 2008]. Se le denomina tigmotropismo a la capacidad que le permite encontrar discontinuidades entre las células y así penetrar en los tejidos. Brand y cols. demostraron que el tigmotropismo está regulado por la absorción de calcio extracelular [Brand 2007]. Esta última podría explicar su presencia en las infecciones apicales persistentes.
- Evasión e inmunomodulación de las defensas del huésped: *C. albicans* puede evadir las defensas del huésped principalmente de los neutrófilos polimorfonucleares bloqueando sus funciones, estas células parecen ser las células inflamatorias más importantes involucrados en la defensa contra *C. albicans* [Ashman 1995]. También por medio de la producción de proteinasas pueden degradar los factores del complemento e inmunoglobulinas (IgG1, IgA1, y IgA2) [Ogrydziak 1993; Chaffin 1998].

Por medio de los constituyentes de la pared celular como el glucano, quitina y manoproteínas tienen inmunomoduladores de activación o depresión de efectos que pueden estar involucrados en la patogénesis de las lesiones periapicales a través de un mecanismo indirecto, *C. albicans* es capaz de estimular la síntesis de citocinas proinflamatorias que son liberadas por los macrófagos, células endoteliales y fibroblastos [Sundstrom 2002; Zhu 2010; Dalle 2010].

Todas estas características contribuyen a su notable capacidad de coexistir como un comensal y su prevalencia como patógeno en las infecciones periapicales crónica y persistentes [Vylkova 2011; Mayer 2012].

2.1.4. Fisiopatología de las infecciones intraconducto

Cuando las bacterias, toxinas y productos derivados del metabolismo microbiano tienen contacto indirecta o directamente con el tejido pulpar por cualquiera de las vías antes descritas, se presentará un proceso inflamatorio (pulpitis).

Las lesiones pulpares leves pueden no causar cambios importantes en la pulpa, pero las lesiones pulpares moderadas o graves producirán una inflamación localizada. Antes de la aparición de cambios inflamatorios en la pulpa hay un daño celular (vacuolización) y reducción general del tamaño de los odontoblastos [Trowbridge 2002; Cohen 2011; Trowbridge 1981], como consecuencia de la irritación microbiana. Esta respuesta puede favorecer el paso de los microorganismos hacia el tejido pulpar por la formación de un trayecto no vital o trayecto muerto dentro de los túbulos dentinarios, donde los túbulos carecen de prolongaciones odontoblásticas siendo altamente permeables como consecuencia de la necrosis temprana de los odontoblastos [Cohen 2011; Trowbridge 1981; Walton 2010; Craig 2003; Seltzer 1972].

Posteriormente, se presenta la respuesta en los tejidos duros (dentina) frente a la agresión microbiana y comprende de una disminución en la permeabilidad de la dentina y la formación de nueva dentina (terciaria o reparadora). Activándose así, las reacciones inflamatorias e inmunológicas (este tema se explicará más adelante) **[Cohen 2011; walton 2010; Craig 2003; Bergentholtz 1991]**. La permeabilidad dentinaria disminuye debido a la esclerosis dentinaria, que consiste en un incremento en la dentina peritubular que impide la difusión de metabolitos microbianos a través de los túbulos dentinarios **[Trowbridge 1981; Seltzer 1972; Bergentholtz 1981; Roberto 1994]**. En esta reacción los túbulos dentinarios se llenan parcial o totalmente con depósitos minerales de apatita y otros cristales **[Cohen 2011; Trowbridge 1981]**. Por otro lado, la formación y cantidad de dentina reparadora será proporcional a la cantidad de dentina primaria destruída. La dentina reparadora muestra menor cantidad de túbulos dentinarios, son más estrechos, irregulares y con trayectos más curvos, los cuales terminan de manera bien definida en el límite con la dentina primaria cuyos túbulos dentinarios son de aspecto regular **[Trowbridge 1981; Seltzer 1972; Roberto 1994]**.

Conforme los microorganismos avancen hacia el tejido pulpar aumentará el grado de inflamación. El tejido pulpar puede permanecer inflamado por mucho tiempo o sufrir necrosis (muerte del tejido pulpar) como consecuencia del aumento en la presión intrapulpar. El aumento de la presión dentro de la cámara pulpar resulta de la acumulación de células inflamatorias extravasculares y del líquido intersticial, que no ceden por la **[Siqueira 2004]** reducida distensibilidad que tiene el tejido pulpar inflamado dentro del conducto constituido por un tejido rígido (dentina) **[Craig 1997; Walton 2010]**.

En una infección prolongada no sólo habrá mayor cantidad de microorganismos en el conducto principal, sino que también estarán en el interior de los conductos accesorios y de los túbulos dentinarios **[Orstavik 1999]**.

2.2. Microbiota de las infecciones intraconducto

La microbiota presente en las infecciones pulpares es menos diversa en comparación con la microbiota bucal. En las infecciones pulpares podemos encontrar una amplia diversidad de especies como podemos observar en la **(Tabla 1) [Narayanan 2010; Siqueira 2005]**, aunque se caracteriza por un predominio de bacterias anaerobias estrictas. Estudios basados en cultivos microbiológicos han permitido llegar a conocer todos estos microorganismos patógenos que infectan al tejido pulpar. Recientemente el uso de técnicas moleculares como PCR, técnicas de hibridación, microarrays, sondas de DNA, técnicas de secuenciación, por mencionar algunas; han permitido identificar nuevos patógenos implicados en las infecciones pulpares, como se observa en la **(Tabla 2)** y gracias a esta tecnología se ha ampliado el conocimiento de la microbiota patógena pulpar **[Brito 2007; Siqueira 2009; Tavares 2011]**.

También se han aislado en estas infecciones pero en menor cantidad otros microorganismos como especies de hongos principalmente levaduras de *C. albicans* y rara vez otras especies como se muestran en la **(Tabla 3) [Siqueira 2004; Gomes 2010; Nastri 2011; Cohen 2011]**; arqueas metanogénicas como *Methanobrevibacter oralis* que se ha encontrado en enfermedad periodontal y periodontitis apical asintomática **[Vianna 2006]**; y algunos virus como especies de *Herpesvirus* (Citomegalovirus humano y virus de Epstein-Barr). Los virus requieren células del huésped viables para infectar y replicar su genoma viral, por lo tanto, no pueden sobrevivir en el conducto radicular necrótico.

La presencia de virus en el conducto radicular se ha reportado en pulpas vitales no inflamadas de pacientes infectados con el virus de VIH y con el virus del herpes, cuando las células vivas se encuentran en abundancia. Su participación está en que debilitan la respuesta inmune del huésped, favoreciendo el

sobrecrecimiento de las bacterias, principalmente en el segmento apical [Cohen 2011].

Tabla 1. Especies bacterianas presentes en infecciones pulpares.		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Prevotella oris</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Prevotella pallens</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Prevotella tanneriae</i>
<i>Actinomyces radicidentis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	<i>Lachnospiracea</i> sp.	<i>Propionibacterium propionicum</i>
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>Mogibacterium neglectum</i>	<i>Pyramidobacter piscolens</i>
<i>Campylobacter curvus</i>	<i>Mogibacterium pumilum</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Mogibacterium timidum</i>	<i>Slackia exigua</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Mogibacterium vesicum</i>	<i>Slackia heliotrinireducens</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Solobacterium moorei</i>
<i>Catonella morbi</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Centipeda periodontii</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Olsenella profusa</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Olsenella uli</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Cryptobacterium curtum</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Dialister invisus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Dialister pneumosintes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Prevotella baroniae</i>	<i>Treponema lecithinolyticum</i>
<i>Eubacterium infirmum</i>	<i>Prevotella buccae</i>	<i>Treponema maltophilum</i>
<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Prevotella dentalis</i>	<i>Treponema parvum</i>
<i>Filifactor alocis</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Treponema putidum</i>
<i>Fingoldia magna</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Treponema socranskii</i>
<i>Fusobacterium nabiforme</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Prevotella multissacharivorax</i>	

sp: especies.

Tabla 2. Nuevas especies bacterianas identificadas por medio de técnicas moleculares presentes en infecciones pulpares.

<i>Actinobaculum</i> oral clone EL030	<i>Synergistes</i> oral clone BH017
<i>Atopobium</i> genomsp. C1	<i>Synergistes</i> oral clone D084
<i>Bacteroidetes</i> oral clone X083	<i>Synergistes</i> oral clone E3_33
<i>Desulfobulbus</i> oral clone R004	<i>Synergistes</i> oral clone W028
<i>Lachnospiraceae</i> MCE7_60	<i>Synergistes</i> oral clone W090
SR1 oral clone X112	TM7 oral clone I025
<i>Synergistes</i> oral clone BA121	TM7 oral clone AH040

Genomosp.: geno especie o especie genética.

Tabla 3. Especies de hongos aislados en infecciones pulpares.

<i>Aspergillus granulosis</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Emericella quadriluniata</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Eurotium amstelodame</i>
<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Penicillium citrionigrum</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Penicillium implicatum</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Penicillium lividum</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Penicillium micsynvisk</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.3. Biopelícula intraconducto

Con el uso de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) Nair en el año de 1987, examinó el contenido de los conductos radiculares de dientes con caries y el tejido inflamatorio periapical adjunto en dientes extraídos. Durante sus observaciones señaló la existencia de cocos, filamentos y espiroquetas, que se encontraban mayormente suspendidos en un espacio del conducto húmedo, la presencia de agregados y capas de condensaciones bacterianas adheridas a las paredes del canal radicular y un material amorfo que llenaba los espacios interbacterianos. Cuando estaban presentes estas condensaciones bacterianas, se observaban como una estructura empalizada similar al de la placa dentobacteriana lo que llevó a la conclusión de que los mecanismos para la unión bacteriana eran similares como aquellos para la formación de la placa dentobacteriana **[Nair 1987]**.

Más tarde, Sen y cols., en el año de 1995 por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), investigaron las paredes de los conductos radiculares en dientes infectados y encontraron que las bacterias formaban densas colonias en las paredes del conducto, así como en los túbulos dentinarios; adicionalmente observaron que los hongos eran capaces de formar colonias separadas de las paredes del conducto radicular **[Sen 1995]**.

Actualmente la aplicación de nuevas técnicas de microscopía y de biología molecular ha permitido tener un avance en el estudio y comprensión de las biopelículas que podemos encontrar en la cavidad bucal y un conocimiento más detallado de las interacciones microbianas esenciales para su formación. De igual manera las técnicas de cultivo modernas han sido muy útiles para demostrar la asociación de bacterias orales con la patología pulpar y periapical **[Brito 2007]**.

Formación de la biopelícula intraconducto

Un conducto radicular con tejido pulpar necrótico constituye un espacio para la colonización bacteriana proporcionando a las bacterias un entorno húmedo, cálido, nutritivo y anaerobio al que, por lo general, no pueden acceder las defensas del huésped debido a la falta de microcirculación activa en el conducto radicular y la barrera que proporciona la biopelícula.

La biopelícula intraconducto se forma en las paredes dentinarias del conducto radicular necrótico donde los microorganismos que lo conforman pueden invadir los conductos accesorios y los túbulos dentinarios. Los túbulos dentinarios tienen suficiente diámetro para permitir el paso de la mayoría de las bacterias orales y se han observado infecciones tubulares en la mayoría de los dientes que tenían lesiones de periodontitis apical. Aunque es más frecuente observar una penetración intratubular más superficial, algunas bacterias pueden penetrar hasta 300 μm , como se puede observar en la **(Fig. 11)**.

En la infección prolongada de los conductos radiculares, los microorganismos se propagan por todo el sistema de conductos disminuyendo la disponibilidad de nutrientes y alteran el estado ambiental dentro de este, convirtiéndose en un ambiente más anaeróbico que dificulta la supervivencia de estos microorganismos. Por esta razón, tienden a ubicarse en zonas específicas del conducto radicular necrótico, que les garanticen su supervivencia así como también el poder expresar factores de virulencia que les permitan agregarse, colonizar e invadir los tejidos del huésped. La formación de la biopelícula intraconducto es un medio por el cual los microorganismos sobreviven a estas condiciones ambientales y nutricionales desfavorables **[Walton 2010; Nair 2000]**.

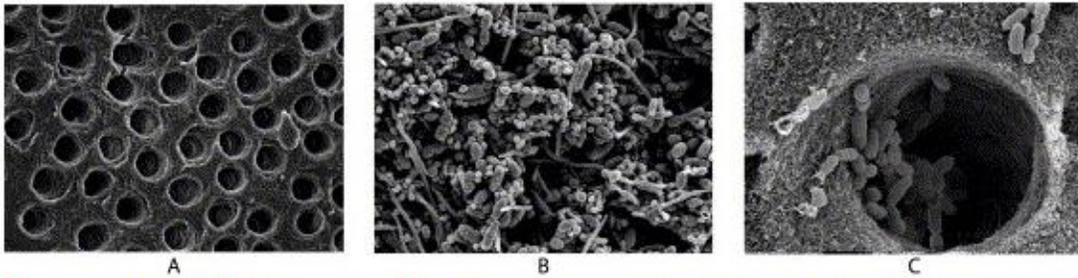


Figura 11. La biopelícula intraconducto se forma en las paredes dentinarias del conducto radicular necrótico donde los microorganismos que lo conforman pueden invadir los conductos accesorios y los túbulos dentinarios. En la figura A se observa una micrografía electrónica de barrido (SEM) de la dentina libre de bacterias. En la figura B la imagen tomada con SEM muestra la presencia de cocos, bacilos y organismos filamentosos conformando la biopelícula intraconducto. En la figura C se observa por medio de SEM como un conjunto de microorganismos ha invadido el interior de un túbulo dentinario. Aunque es más frecuente observar una penetración intratubular más superficial, algunas bacterias pueden penetrar unas 300 μm .

En la pulpitis irreversible la principal fuente energética de las bacterias lo constituyen el líquido intersticial, los residuos de descomposición pulpar y el plasma sanguíneo, que varía conforme avanza el tiempo y la progresión de la inflamación. Inicialmente las bacterias sacarolíticas utilizan los glúcidos obtenidos del medio para su nutrición, de esta forma se libera ácido láctico y fórmico como producto de su metabolismo. Conforme avanza la inflamación los glúcidos se agotan y los aminoácidos se convierten en la única fuente nutritiva, que resultan de la hidrólisis de las proteínas tisulares. Esta fuente nutritiva es utilizada por bacterias anaerobias como *Porphyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Fusobacterium* sp., *Eubacterium* sp. y *Parvimonas* sp. De esta forma se va dando una transformación de una flora básicamente aerobia y anaerobia facultativa a una flora predominantemente de tipo anaerobia facultativa y estricta [Cohen 2011].

Como se mencionó anteriormente (capítulo 1), el primer paso para que inicie la formación de la biopelícula es la adhesión bacteriana. El reconocimiento entre especies, la coagregación y la sinergia metabólica contribuyen al desarrollo de la biopelícula intraconducto [Jenkinson 2011]. Se han reportado varias asociaciones bacterianas en conductos radiculares necróticos, las cuales se describirán a continuación por géneros:

- *Streptococcus* sp.: son bacterias anaerobias facultativas, que se unen a una amplia variedad de microorganismos orales lo que le permite desarrollar redes microbianas complejas que estabilizan a las comunidades. Algunas especies de este género pertenecen al grupo de los colonizadores primarios, ya que expresan una diversidad de moléculas en la superficie celular para la adhesión [Palmer 2001]. También tienen la capacidad de alterar el potencial patógeno de la biopelícula, influir en el desarrollo de esta y puede elevar el potencial patógeno de otras bacterias. Por ejemplo, puede mejorar el crecimiento y la virulencia de *P. gingivalis* y *T. denticola* [Whitmore 2011]. Una relación antagónica entre especies de *Streptococcus* se ha observado entre *S. sanguinis* y *S. mutans*, y se basa en la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por *S. sanguinis* y las bacteriocinas producidas por *S. mutans* [Kreth 2005].

También proporcionan sitios receptores únicos para: *F. nucleatum* [He 2012], *T. forsythia*, *T. denticola* y *P. gingivalis* [Kuboniwa 2010; Perisasamy 2010].

- *Fusobacterium* sp.: *F. nucleatum* se ha aislado con frecuencia en infecciones pulpares primarias, tiene la capacidad de tolerar altas concentraciones de oxígeno por lo que puede ayudar a reducir el oxígeno presente en el medio para permitir el crecimiento de bacterias anaeróbicas estrictas [Kolenbrander 1995]. También puede elevar el pH de su entorno a través de la generación de amoníaco, lo que neutraliza los ácidos producidos por otros microorganismos y crea un entorno más favorable para las bacterias sensibles al ácido, como por ejemplo *P. gingivalis* [Takahashi 2003]. Puede encontrarse solo o en asociación con: *Enterococcus* sp. y / o *P. gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Selenomonas sputigena*, *Campylobacter rectus* y *Porphyromonas endodontalis*. *F. nucleatum* se ha encontrado asociado con

una amplia variedad de microorganismos orales [Cisar 1979; George 1992; Kolenbrander 1989; Kolenbrander 1989].

- Porphyromonas sp.: la presencia de *Porphyromonas* sp. y sin duda, su asociación con otras bacterias puede contribuir a la patogenicidad y el mantenimiento del proceso infeccioso. La disponibilidad de nutrientes, la baja tensión de oxígeno y las interacciones con otras bacterias dentro de los conductos radiculares necróticos, son determinantes ecológicos importantes para estas bacterias. Puede encontrarse asociada con: *Porphyromonas* sp. con *Prevotella* sp., *P. gingivalis* con *Enterococcus* sp., *F. nucleatum* y *T. denticola* (*P. gingivalis* produce ácido isobutírico que estimula el crecimiento de *T. denticola*, mientras que *T. denticola* produce ácido succínico que aumenta el crecimiento de *P. gingivalis*) [Kolenbrander 2002; Cogoni 2012].
- Prevotella sp.: *P. intermedia* es afín a *P. micra*, *Peptostreptococcus anaerobius* y a *Eubacterium* sp; mientras que, *P. endodontalis* inhibe su crecimiento. Algunas asociaciones de bacterias resultan más potentes que otras, por ejemplo, la unión entre *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Fusobacterium* sp. y *Parvimonas* sp. incrementan el grado de destrucción periapical.
- Treponema sp.: las espiroquetas tales como *T. denticola* y *Treponema socranskii* se han detectado en infecciones pulpares primarias. Se ha encontrado en asociación con: *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *Enterococcus* sp., *Prevotella nigrescens* y *P. endodontalis* [Ikegami 2004;. Sharma 2005].
- Dialister sp.: *D. pneumosintes* ha sido aislado de infecciones endodónticas primarias y en asociación con *P. nigrescens*. Ambos microorganismos tienen un efecto sinérgico en la sitios infectados principalmente en las lesiones periapicales.
- Enterococcus sp.: *Enterococcus faecalis* junto con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* se encuentra en grandes números y su presencia puede contribuir al

desarrollo de infecciones crónicas, tales como periodontitis. Estas bacterias podrían ser muy resistentes contra los agentes antimicrobianos.

- Candida sp.: algunas especies de *Candida* han demostrado coagregarse con ciertas bacterias orales como por ejemplo: *Candida dubliniensis* con *F. nucleatum*, *Candida tropicalis* con *S. gordonii*, *C. albicans* con *Actinomyces* sp., *Candida* sp. con *F. nucleatum*, *C. albicans* con *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *Streptococcus anginosus* [Holmes 1995; Jenkinson 1990; Siqueira 2004].

En la etapa final de desarrollo de la biopelícula, el desprendimiento de los microorganismos puede ocurrir como una consecuencia del antagonismo o exclusión, en donde los microorganismos que conforman la biopelícula regresan al estado planctónico. Esta acción les puede permitir invadir y colonizar nuevos nichos.

2.3.1. Factores que influyen en la formación de la biopelícula intraconducto

Los principales factores que influyen para que los microorganismos formen la biopelícula intraconducto son:

- Factores nutricionales: dentro de los conductos radiculares, las bacterias pueden utilizar diversas fuentes de nutrientes como el tejido pulpar necrótico, las proteínas y glucoproteínas del líquido intersticial o exudado que se filtran de los agujeros apicales y laterales, los componentes de la saliva que penetran coronalmente hacia el conducto y los productos del metabolismo microbiano. Todos estos aportan una fuente nutricional importante en las fases iniciales de la colonización bacteriana. En fases más avanzadas del proceso infeccioso, las condiciones nutricionales sólo

favorecerán a aquellos microorganismos que metabolizan péptidos y aminoácidos [Walton 2010].

- Tensión de oxígeno y potencial redox: en las fases tempranas del proceso infeccioso pulpar predominan las bacterias facultativas, pero al cabo de algunos días o semanas disminuye el oxígeno en el interior del conducto radicular a causa de la necrosis pulpar y por el consumo de las bacterias facultativas. De esta manera se crea un entorno anaerobio con un potencial redox reducido, favoreciendo especialmente a las bacterias anaerobias estrictas [Walton 2010; Negroni 2009]. Por lo tanto, las bacterias presentes dentro del sistema de conductos, sobre todo las que se encuentran en tercio medio y apical deben ser capaces de resistir y adaptarse a estos cambios asociándose en una biopelícula [Siqueira 2008].
- Propiedades físicas de la superficie: la rugosidad de la superficie, puede aumentar el área de superficie y por lo tanto aumentar la colonización. En un estudio se demostró que se produce más rápidamente una biopelícula sobre una superficie rugosa [Bos 1999; Quirynen 1995]. La composición química de una superficie también puede afectar en la colonización microbiana, ya que puede contener componentes beneficiosos o perjudiciales [Roberts 1999].
- Interacciones microbianas: como se mencionó anteriormente las interacciones positivas favorecen la supervivencia de los microorganismos que interactúan e incrementan las probabilidades de, que determinadas especies coexistan en el nicho. Por el contrario, las interacciones negativas limitarán la densidad de la población que conforma a la biopelícula intraconducto [Walton 2010].

2.4. Respuesta inmunológica en la infección pulpar

Dependiendo de la intensidad, duración de la agresión y de la capacidad de respuesta del huésped, se puede presentar una inflamación pasajera (pulpitis reversible) hasta una pulpitis irreversible y posterior necrosis pulpar **[Walton 2010]**.

La inflamación pulpar comienza como una respuesta inmunológica de bajo grado a los antígenos bacterianos en vez de una reacción inflamatoria aguda. El infiltrado celular inflamatorio inicial consiste casi completamente de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, cabe mencionar que este tipo de infiltrado celular es típico de una reacción inflamatoria crónica. Adicionalmente, existe una proliferación de pequeños vasos sanguíneos y fibroblastos con depósito de fibras colágenas, esta es la razón por la cual no toda reacción inflamatoria resulta en una lesión permanente (pulpitis reversible). La inflamación crónica es considerada generalmente como una reacción inflamatoria reparativa, ya que todos los elementos necesarios para la cicatrización están presentes. Cuando las bacterias son eliminadas antes de que alcancen la pulpa, el proceso inflamatorio se resuelve y la cicatrización ocurre **[Trowbridge 2002]**.

La pulpa sufre una inflamación aguda cuando las bacterias invaden la dentina reparadora que se ha formado antes de la lesión. Durante esta respuesta se dilatan los vasos sanguíneos y pueden encontrarse algunas células inmunológicamente competentes como diversos subtipos de linfocitos como T4 o ayudadores, T8 o citotóxicos y células B, células dendríticas y macrófagos que progresivamente aumentan en cantidad. Por otra parte, las vénulas se congestionan o colapsan y existe evidencia de edema **[Trowbridge 1981; Roberto 1994; Rodriquez 2003; Seltzer 1970]**. La reacción inflamatoria en esta etapa está determinada por un aumento del flujo sanguíneo, aumento del volumen de los vasos, de la permeabilidad vascular y exudado. Esto como consecuencia del extravasamiento de líquidos plasmáticos, donde se da un aumento de la viscosidad de la sangre y

disminución en la velocidad del flujo sanguíneo. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los elementos de la primera línea de defensa los cuales se dirigen hacia la periferia de los vasos donde el flujo es más lento, lo que se conoce como marginación leucocitaria. A continuación, los neutrófilos atraviesan las paredes de los vasos y pasan a los espacios extravasculares **[Bergentholtz 1981]**.

Una vez que los microorganismos tienen contacto con el tejido pulpar, se produce una acumulación masiva de PMN gracias a sustancias quimiotáxicas liberadas por las propias bacterias y por la activación bacteriana del sistema del complemento; formando microabscesos o zonas de supuración. Mientras más microorganismos invadan el tejido pulpar, los mecanismos de defensa eventualmente serán vencidos **[Trowbridge 2002; Bergentholtz 1981]**.

El tejido pulpar cuenta con un aporte sanguíneo relativamente limitado en relación con el volumen de tejido presente en el espacio de la cámara y los conductos radiculares, por lo que cuando la demanda de elementos inflamatorios es mayor a la posibilidad que tiene el sistema vascular de transportarlos hasta el sitio del daño, los microorganismos crecen sin oposición dentro del sistema de conductos causando necrosis pulpar **[Trowbridge 2002]**. La necrosis pulpar es la descomposición séptica o no, del tejido conjuntivo pulpar que cursa con la destrucción del sistema microvascular y linfático de las células, y en última instancia de las fibras nerviosas **[Pumarola 2001]**. Por lo tanto, la necrosis pulpar es totalmente asintomática, siempre y cuando no afecte a los tejidos periapicales. En estos casos, la existencia de sintomatología ya no dependerá propiamente del proceso pulpar, sino de la infección periapical **[Cohen 2011; Marshall 1970]**.

La necrosis del tejido se desarrolla cuando los PMN mueren y liberan metabolitos activos del oxígeno y proteasas. Los PMN contienen más de 20 proteasas, de las cuales las más importantes son la elastasa, la gelatinasa y la colagenasa, esta combinación da como resultado una necrosis por licuefacción. Al

igual que las proteasas, las enzimas lisosomales de los PMN tienen un rol importante en la digestión de los microorganismos fagocitados, ya que contribuyen en la destrucción del parénquima pulpar debido a que no discriminan entre el tejido del huésped y el agente extraño **[Trowbridge 1981]**. El desarrollo de la necrosis pulpar, también se ve favorecido por el aumento en la presión intrapulpar por un drenaje insuficiente de los líquidos intersticiales (producto de la inflamación), dando lugar a la destrucción progresiva e inadvertida del tejido como consecuencia de la falta de circulación colateral y rigidez de las paredes dentinarias **[Ingle 2004]**.

3. Microbiota de las infecciones periapicales y formación de biopelícula

3.1. Infección periapical

La infección periapical se presenta cuando el proceso inflamatorio y sus productos, los metabolitos provenientes de la degradación del tejido pulpar y/o las bacterias y sus toxinas, se acercan al tejido conjuntivo de la unión pulpo-periapical [Mousavi 2006]. Una vez que los microorganismos colonizan el conducto radicular necrótico hasta la porción apical pueden invadir a través de diferentes vías de infección los tejidos periapicales inflamados [Walton 2010].

3.1.1. Vías de infección periapical

Existen diversas vías de infección que permiten la comunicación entre el conducto radicular necrótico y los tejidos periapicales. Los microorganismos pueden invadir estos tejidos a través de las siguientes vías (Fig. 12):

- Foramen apical: El foramen apical es la principal vía de comunicación entre el conducto radicular y los tejidos periapicales. Este puede tener una terminación única o dividirse en múltiples terminaciones (delta apical).
- Conductos accesorios, secundarios y laterales: Los conductos laterales son aquellos que se extienden desde el conducto radicular principal en dientes unirradiculares y multirradiculares, hacia el ligamento periodontal de forma perpendicular. Los conductos secundarios se extienden desde el conducto principal al ligamento periodontal en la región apical y los conductos accesorios se derivan de conductos secundarios ramificándose hacia el ligamento periodontal en la región apical.
- Túbulos dentinarios: Son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden por todo el espesor de la dentina desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria o cementodentinaria. Los túbulos dentinarios hacen

permeable a la dentina, ofreciendo una vía de entrada a los irritantes provenientes del tejido pulpar inflamado o necrótico y de los microorganismos presentes en el tejido pulpar infectado [Cohen 2011].

- Vía periodontal: Los microorganismos del surco gingival pueden llegar al tejido pulpar a través del ligamento periodontal, usando un conducto lateral o el foramen apical como un camino.
- Anacoresis: Los microorganismos circulantes en la sangre o linfa pueden ser atraídos hacia el tejido pulpar inflamado y colonizarlo, también se le conoce como bacteremia transitoria.
- Extensión: Los microorganismos de un diente infectado pueden migrar a uno con tejido pulpar y periapical sano por la cercanía de los tejidos comenzando así, el proceso inflamatorio e infeccioso.

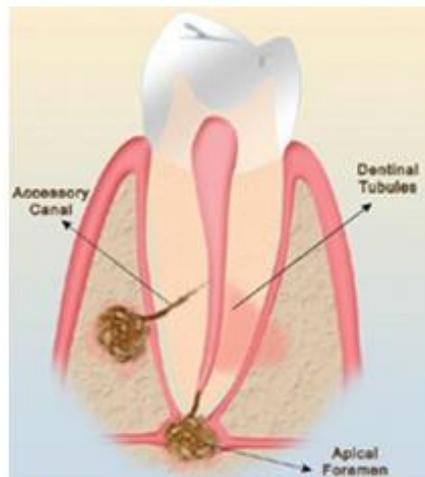


Figura 12. Se muestran las principales vías de infección que comunican el tejido pulpar infectado con los tejidos periodontales, estas son: los túbulos dentinarios, los conductos accesorios y el foramen apical.

3.1.2. Clasificación de las infecciones periapicales

Las lesiones periapicales se clasifican de la siguiente manera **[Cohen 2011]**:

- Periodontitis apical sintomática (aguda): Se presenta por la extensión inicial de la inflamación pulpar hacia el ligamento periodontal de la región apical. Entre los factores irritantes que pueden provocar esta alteración encontramos a los mediadores inflamatorios de una pulpa inflamada irreversiblemente, las toxinas bacterianas procedentes de las pulpas necróticas, las restauraciones en hiperoclusión, la sobreinstrumentación del conducto radicular, la extrusión de los materiales de restauración y determinadas sustancias químicas (irritantes o desinfectantes) **[Torabinejad 2002]**.
- Periodontitis apical asintomática (crónica): Es causada por la necrosis de la pulpa y suele presentarse como una secuela de la periodontitis apical sintomática. Desde el punto de vista histológico, la periodontitis apical asintomática se clasifica en granuloma y quiste periapical.
- Osteítis condensante: Es una variante de la periodontitis apical asintomática que se caracteriza por un aumento del hueso trabecular como respuesta a una irritación persistente. La principal causa de la osteítis condensante, es la difusión los agentes irritantes provenientes del conducto radicular hacia los tejidos periapicales. Esta lesión suele localizarse alrededor de los ápices de los dientes inferiores posteriores que presentan una probable causa de inflamación o necrosis pulpar. Sin embargo, la osteítis condensante puede aparecer en el ápice de cualquier diente.
- Absceso apical agudo: Es un proceso inflamatorio de origen pulpar que afecta a los tejidos periapicales. Se presenta una destrucción de los tejidos periapicales y un proceso inflamatorio severo, como respuesta ante irritantes procedentes de los microorganismos y de la necrosis del tejido del

conducto radicular [Torabinejad 2002]. Un absceso consiste en una acumulación de pus en una cavidad por la licuefacción del tejido pulpar y este puede ser localizado o difuso. En muchos casos el absceso no se comunica directamente con el agujero apical.

- Absceso apical crónico: Es un trastorno inflamatorio de origen pulpar que se caracteriza por la presencia de una lesión previa que ha dado paso a un absceso, que drena hacia una superficie mucosa (conducto sinusal) o cutánea. Suele asociarse a una periodontitis apical crónica que ha formado un absceso y puede clínicamente confundirse con un absceso periodontal.

3.1.3. Fisiopatología de las infecciones periapicales

El principal agente etiológico de las infecciones periapicales es la necrosis del tejido pulpar. Esta condición deriva de una pulpitis irreversible no tratada, una lesión traumática o cualquier circunstancia que origine interrupción prolongada de la irrigación sanguínea al tejido pulpar [Bergentholtz 1981].

El sistema de conductos radiculares infectado puede albergar grandes cantidades de irritantes debido a los cambios patológicos del tejido pulpar, cuando los productos del proceso inflamatorio, bacterianos y de la necrosis pulpar se difunden o diseminan a los tejidos periapicales a través de las vías antes descritas, se desarrollará una respuesta inflamatoria (periodontitis apical) y posteriormente la formación de una lesión periapical [Walton 2010].

A diferencia del tejido pulpar, los tejidos periapicales poseen una fuente casi ilimitada de células indiferenciadas que pueden participar en el proceso inflamatorio y de reparación. Además, estos tejidos disponen de una vascularización colateral y un sistema de drenaje linfático muy extenso. La interacción entre los irritantes procedentes del espacio radicular y de las defensas del huésped pone en marcha un sistema muy amplio de reacciones de protección. Pero algunas de estas

reacciones pueden tener consecuencias destructivas, como la reabsorción del hueso perirradicular. La reabsorción ósea crea una separación entre los irritantes y el hueso, evitando de este modo la osteomielitis **[Walton 2010]**.

Cuando los componentes antigénicos llegan al ápice, el tejido afectado muestra una serie de cambios histológicos que van desde una reacción inflamatoria aguda hasta el desarrollo de una inflamación de tipo crónico. En este último, los microorganismos localizados en la zona apical del conducto radicular se encuentran rodeados por los tejidos periapicales inflamados y por acumulaciones de PMN, así como por capas de tejido epitelial localizado a nivel del foramen apical de esta forma el huésped monta un sistema de defensa que impide la propagación de la infección. Este sistema de defensa se observa histológicamente como un granuloma, que es una acumulación de tejido granulomatoso con gran infiltrado de monocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y en ocasiones PMN o como un quiste, que es una cavidad patológica revestida en su interior con epitelio y externamente con tejido conectivo fibroso, en cuyo interior contiene líquido o material semisólido.

Dependiendo de la gravedad, la duración de la irritación y de la respuesta del huésped, la patología periapical puede ir desde una inflamación leve hasta una destrucción extensa de los tejidos. Las reacciones implicadas son muy complejas y suelen estar mediadas por mediadores inflamatorios inespecíficos, así como por reacciones inmunitarias específicas (como se describirá más adelante) **[Walton 2010]**.

3.2. Microbiota de las infecciones periapicales

Los microorganismos que infectan el tejido pulpar son el principal agente causal de las infecciones periapicales, en esta lesiones se han aislado diversas especies bacterianas las cuales podemos observar en la **(Tabla 4) [Siqueira 2009]**.

Una vez que el conducto radicular está infectado, la infección progresa apicalmente hasta que los productos bacterianos o las bacterias irritan los tejidos periapicales, estableciéndose una infección periapical. De igual modo, con el empleo de nuevas técnicas moleculares se han identificado nuevos patógenos implicados con las infecciones periapicales, como se muestra en la **(Tabla 5) [Brito 2013]**.

Tabla 4. Especies bacterianas presentes en las infecciones periapicales.

<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Pyramidobacter piscolens</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Slackia exigua</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Solobacterium moorei</i>
<i>Actinomyces radidentis</i>	<i>Olsenella uli</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Treponema amylovorum</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Treponema lecithinolyticum</i>
<i>Catonella morbi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema maltophilum</i>
<i>Centipeda periodontii</i>	<i>Prevotella baroniae</i>	<i>Treponema médium</i>
<i>Dialister invisus</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Treponema parvum</i>
<i>Dialister pneumosintes</i>	<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	<i>Treponema pectinovorum</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Treponema socranskii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Prevotella tanneriae</i>	<i>Treponema vincentii</i>
<i>Eubacterium sulci</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Filifactor alocis</i>	<i>Propionibacterium propionicum</i>	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	

sp: especies.

Se han encontrado también otros microorganismos asociados con las infecciones periapicales como levaduras de *C. albicans* (ver **Tabla 6**) principalmente en infecciones periapicales crónicas y persistentes, arqueas como *Methanobrevibacter oralis* en periodontitis apical asintomática [**Cohen 2011**] y virus como Citomegalovirus humano (CMVH) y el virus de Epstein-Barr (VEB) en periodontitis apical sintomática y asintomática, cerca del foramen apical en zonas de reabsorción y en la superficie externa de la raíz (ápices) [**Cohen 2011; Siqueira 2013; Rocas 2011**]. En un estudio histológico, *C. albicans* se encontró presente en los granulomas periapicales [**Eidelmann 1978**], se observó que el tejido de granulación presentaba una infección invasiva por levaduras e hifas de *C. albicans* y de igual manera, las superficies radiculares estaban también cubiertas por densas masas de levaduras, los túbulos dentinarios estaban totalmente llenos de hifas, como se muestra en la (**Fig. 13**) [**Waltimo 2003**]. Estos microorganismos se aíslan principalmente en infecciones periapicales de pacientes inmunocomprometidos.

Tabla 5. Nuevas especies bacterianas presentes en infecciones periapicales identificadas por medio de técnicas moleculares.

<i>Atopobium</i> genomosp. C1	<i>Synergistes</i> oral clone BA121
<i>Bacteroidetes</i> oral clone X083	<i>Synergistes</i> oral clone BH017
<i>Desulfobulbus</i> oral clone R004	<i>Synergistes</i> oral clone W028
<i>Dialister</i> oral clone BSO16	<i>Synergistes</i> oral clone W090
<i>Eubacterium</i> oral clone BP 1_89	<i>Synergistes</i> oral clone E3_33
<i>Lachnospiraceae</i> oral clone 55A_34	TM7 oral clone 1025
<i>Lachnospiraceae</i> oral clone CE7_60	TM7 oral clone AH040
<i>Migasphaera</i> oral clone BSO16	<i>Veillonella</i> oral clone BP 1_85
<i>Prevotella</i> oral clone PUS 9.180	

genomosp: genoespecie o especie genética.

Tabla 6. Especies de hongos aislados en infecciones periapicales.

<i>Candida albicans</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida tropicalis</i>	

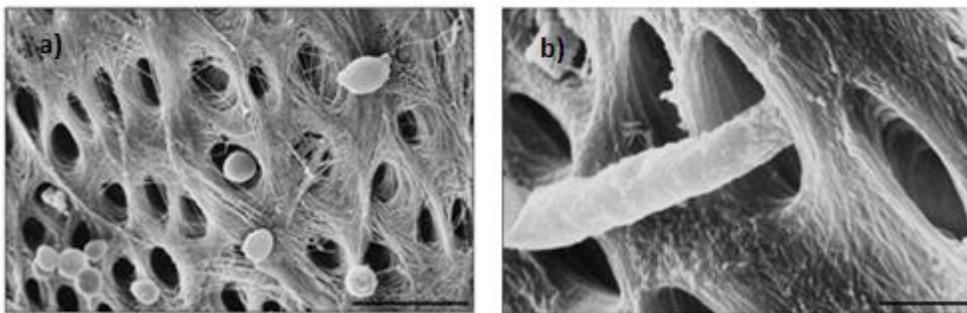


Figura 13. Imagen a) Micrografía electrónica de barrido donde se observan las blastosporas de *C. albicans* sobre superficie del canal radicular, invadiendo también los túbulos dentinarios (10 μ m). Imagen b) Micrografía electrónica de barrido donde se observa la invasión de los túbulos dentinarios por hifas de *C. albicans* (2 μ m).

3.3. Biopelícula extrarradicular

Tronstad y cols. en el año de 1990, evaluaron la superficie de los ápices radiculares de dientes extraídos con SEM y observaron que el vértice de las raíces adyacentes a el foramen apical estaba revestido con una capa continua con un contenido y variedad menor de microorganismos (cocos, bacilos y filamentos) comparado con los de la biopelícula intraconducto (**Fig. 14**). También encontraron que en las irregularidades de las superficie, los microorganismos se mantenían unidos por medio de un material extracelular [Tronstad 1990]. En otro estudio realizado por Lomcali y cols. encontraron que en las zonas donde el cemento presentaba resorción habían células bacterianas y levaduras embebidas en una matriz con una

estructura lisa. Este revestimiento fue considerado como una combinación de productos bacterianos y componentes inflamatorios locales.

Por su parte, Leonardo y cols. con el uso de SEM evaluaron los ápices radiculares de dientes extraídos con diversas condiciones, pulpas vitales o necróticas con o sin lesiones apicales y encontraron que la formación de biopelículas estaba presente sólo en los dientes con periodontitis apical asintomática **[Cohen 2001]**, la presencia de lesiones periapicales crónicas causaban severos cambios en la estructura apical, como una destrucción de las fibras colágenas y diferentes grados de reabsorción del cemento formando lagunas en el que las biopelículas bacterianas persistían, como se puede observar en la **(Fig. 15)** **[Leonardo 2002; Tang 2004]**.

Por lo tanto, cada uno de los microorganismos que tuvieron la capacidad de superar los mecanismos de defensa del huésped en las cercanías del foramen apical y prosperar en el tejido periapical inflamado **[Hornef 2002]**, podrán dentro de este nuevo ambiente interactuar entre sí, para conformar una biopelícula fuera del conducto radicular. Esta biopelícula les permitirá sobrevivir ante las defensas de los tejidos periapicales y continuará de esta forma el proceso inflamatorio en la región periapical.

La biopelícula extrarradicular se forma sobre el cemento perirradicular, en este caso sobre la región periapical de un diente con necrosis pulpar donde existen zonas de reabsorción del cemento **[Frank 2006]**, este tipo de biopelícula se ha encontrado principalmente en dientes con periodontitis apical asintomática y en abscesos apicales crónicos asociados con fístula. La posible calcificación de esta biopelícula se ha asociado con la inflamación y retraso en la cicatrización periapical, lo que contribuye en la persistencia de la infección **[Harn 1998]**. También se ha encontrado que en la región periapical, cuando aun no existen de manera definida estas zonas de reabsorción del cemento, el establecimiento de los microorganismos

en los tejidos periapicales puede darse por su adhesión a la superficie del ápice radicular en forma de estructuras similares a una biopelícula o dentro del cuerpo de la lesión inflamatoria, como colonias cohesivas [Jacinto 2005].

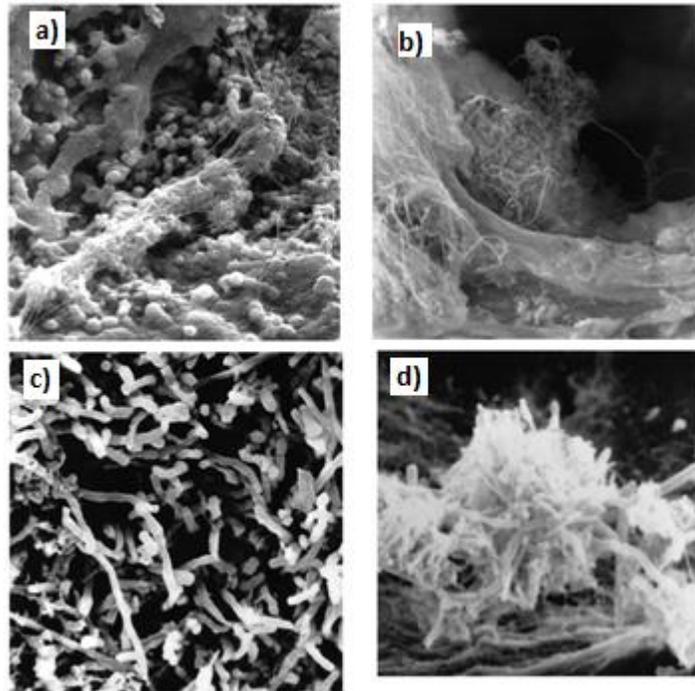


Figura 14. Biopelícula extrarradicular. Se ha observado la presencia de que muestra la presencia: a) cocos, b) filamentos colocados en posición vertical sobre la superficie y c) bacilos. En la imagen d) se observa una biopelícula en la superficie externa apical de la raíz que se compone de filamentos y bacilos.

El tamaño de los agregados bacterianos es importante para que la fagocitosis se lleve a cabo, por lo tanto, las bacterias parecen ser capaces de evadir colectivamente las defensas del huésped mediante la construcción de estas colonias cohesivas. Por ejemplo, las colonias de *Actinomyces* sp. pueden vivir en equilibrio con los tejidos del huésped sin necesariamente inducir una respuesta aguda, sino más bien, permiten el mantenimiento de la inflamación periapical crónica. Esta relación puede deberse a la baja patogenicidad de estos microorganismos y la mínima respuesta del huésped, pudiendo ser la razón de la perpetuación de la

lesión periapical crónica. Por lo tanto, se necesitarían de numerosas células de *Actinomyces* sp. para desarrollar una infección persistente [Kurita-Ochiai

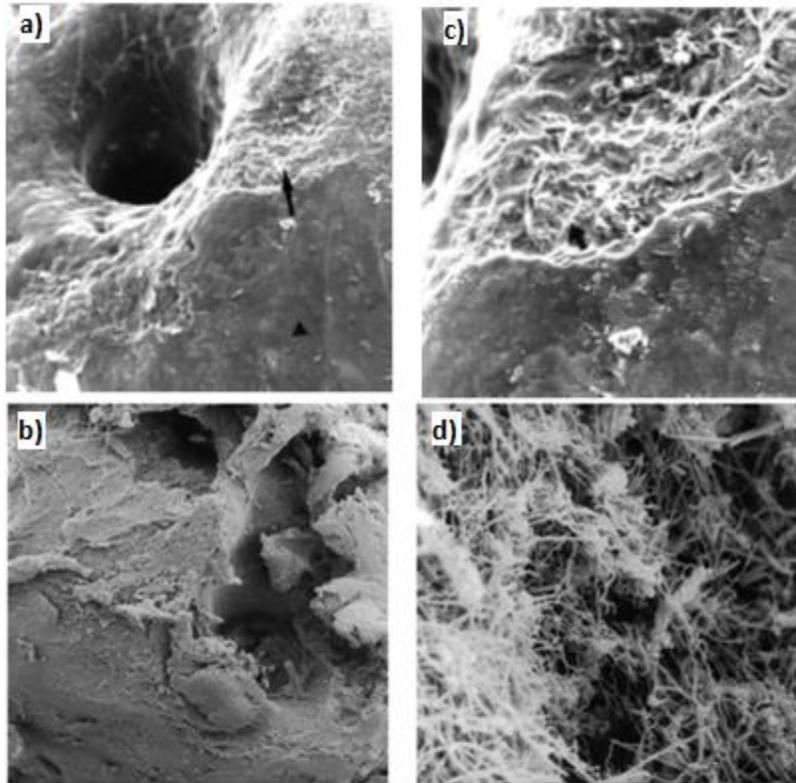


Figura 15. En la imagen a) se puede apreciar el ápice radicular con cambios morfológicos en el cemento radicular cerca del foramen apical, también se muestran áreas de cemento intacto (flecha corta) entre las zonas de resorción (flecha larga), imagen b) se muestran las fibras de colágeno dispuestas en diferentes direcciones que se extiende desde la superficie apical, imagen c) se muestra con un mayor aumento las áreas de resorción del cemento de la imagen a) observándose unas áreas con microorganismos (flecha) y en la imagen d) se muestran con mayor ampliación los microorganismos presentes en las áreas de resorción del cemento radicular.

Cabe mencionar que se ha encontrado frecuentemente, una mayor formación de biopelícula intraconducto en el tercio apical de dientes con grandes lesiones periapicales radiológicas que en aquellos con lesiones pequeñas. Lo que indica que existe una estrecha relación entre la biopelícula intraconducto y en el daño que puede causar a los tejidos periapicales [Sundqvist 1976, Rocas 2008].

Por lo tanto, la severidad de una infección periapical puede relacionarse con los microorganismos que conformen la biopelícula intraconducto, ya que las asociaciones sinérgicas microbianas (como se describieron en el capítulo 2)

contribuyen en el desarrollo de comunidades más virulentas [Kesavalu 1998]. Cada una de las especies que participan en la infección periapical, incluso las especies consideradas como no virulentas y / o presentes en menor cantidad pueden afectar la virulencia de otros miembros de la comunidad. Se ha observado que también los microorganismos que conforman una biopelícula no fomentan infecciones agudas, sino crónicas, debido al tipo de metabolismo del mismo y a sus características [Khemaleelakul 2006].

3.4. Respuesta inmunológica en las infecciones periapicales

A medida que los microorganismos, sus productos metabólicos y los productos de la inflamación pulpar se diseminan hacia los tejidos periapicales las células inmunitarias innatas y adaptativas liberan grandes cantidades de mediadores de la inflamación, por lo que, todos estos mediadores comenzarán a alterar la fisiología de los tejidos periapicales [Walton 2010].

Como se explicó anteriormente, la infección del tejido pulpar y la posterior formación de la biopelícula intraconducto está dada por una gran diversidad microbiana predominantemente anaeróbica Gram negativa, esta infección inicia una respuesta inmunológica en el tejido pulpar para eliminar a los agentes agresores, sin embargo en la mayoría de los casos no se resuelve, ocasionando una necrosis total del tejido pulpar y como resultado de esta alteración se desarrolla una respuesta inmunológica secundaria en los tejidos periapicales (periodontitis apical) [Cortes 1994; Yamasaki 2006; Ohshima 2003].

En consecuencia, se desarrollará una respuesta inmunológica innata inicial, en donde las células epiteliales y endoteliales del ligamento periodontal expresan bajos niveles de moléculas de adhesión y quimiocinas generando un estímulo para la atracción y activación de fagocitos, PMN y citocinas proinflamatorias. Esta respuesta inicia con la vasodilatación, obstrucción vascular, edema, extravasación de macrófagos y leucocitos en el ligamento periodontal. Con esta primera línea de

defensa la invasión de los microorganismos puede limitarse, sin embargo, la virulencia de los mismos pueden darles acceso al foramen apical y establecerse en la superficie externa de la raíz [Stashenko 1998; Anderson 2002; Caviedes-Bucheli 2006].

La presencia y distribución de los microorganismos en los conductos radiculares infectados y su influencia como precursores de las reacciones inflamatorias de los tejidos periapicales establecen una importante asociación de causa y efecto, es decir, si se tiene un número importante de microorganismos con gran virulencia y poca capacidad defensiva, se

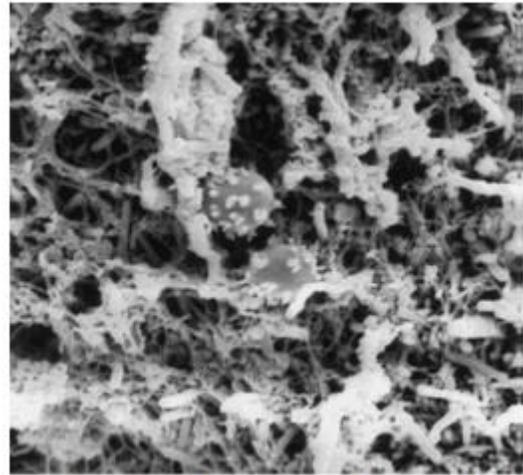


Figura 16. Se pueden observar las células mononucleares en los alrededores o 'dentro' la biopelícula extrarradicular.

desencadenará un proceso inflamatorio agudo; sí por el contrario, el número de microorganismos es reducido, con una virulencia atenuada y tiene buena capacidad defensiva, el proceso inflamatorio dará lugar a un cuadro crónico [Bergenholtz 1981; Hahn 1989; Huang 1999; Mudie 2006]; aquí se determina también la importancia que tiene que un microorganismo forme parte o no de una biopelícula.

También los componentes microbianos juegan un papel importante en la respuesta inmune de los tejidos periapicales, las bacterias anaerobias Gram negativas presentan LPS como componente de la pared celular, tiene la propiedad de incentivar a células inmunocompetentes para producir mediadores moleculares inflamatorios [Tokuda 2001; Wilson 1996]. El LPS, estimula la producción de los metabolitos derivados del ácido araquidónico, especialmente prostaglandinas, la cual produce un aumento de la permeabilidad vascular e induce la resorción ósea. Tanto LPS como el ALT presente en la membrana celular de las bacterias Gram positivas, activan la respuesta inmunológica innata por mecanismos muy similares,

principalmente a través de la activación del sistema del complemento; adicional a esto, ambas tienen la capacidad de inducir la liberación de citocinas proinflamatorias tales como el FNT- α , IL-2, IL-10, IL-4 e interferones (IFN) [Hahn 2004; Tokuda 2001].

Cada una de las endotoxinas y enzimas bacterianas pueden potencializar la infección, ya que pueden promover la inhibición de la quimiotaxia de los neutrófilos y fagocitosis, ver (Fig. 16), garantizan la migración de enzimas lisosómicas, participan en la respuesta inmunológica por la actividad de C3 y C5, inducen la producción de anticuerpos y estimulan la liberación de citocinas inflamatorias [Regueiro 2002]. En general cada microorganismo en particular posee características de virulencia que determinan su mayor o menor patogenicidad.

Cuando los irritantes microbianos no son eliminados el proceso continúa y los componentes del sistema inmune no consiguen contrarrestarla, seguirán llegando más neutrófilos hasta alcanzar un número considerable, al mismo tiempo ocurre la degranulación de los mastocitos en el tejido apical y aumento de la respuesta vascular local por la liberación de aminas vasoactivas como la histamina [Nair 2004]. Durante el proceso, los mediadores inflamatorios causan cambios en las moléculas de adherencia expresadas por el endotelio vascular de los capilares sanguíneos apicales y alrededor de ellos. Estos cambios posibilitan que los neutrófilos de la sangre se adhieran al endotelio vascular activado y se deslicen entre las células endoteliales para entrar en el tejido comprometido, sin embargo a medida que van llegando más neutrófilos al mismo tiempo ocurre la muerte de estos y la liberación del contenido de sus gránulos, de tal manera que la acumulación y muerte local de los neutrófilos representa una causa importante de destrucción tisular durante las fases agudas de la periodontitis apical. Como la inflamación ha sido inducida por factores irritantes microbianos, los neutrófilos no sólo atacarán y destruirán a los microorganismos, sino también liberarán

leucotrienos B4 (LTB4) y prostaglandinas (PG), que atraen más neutrófilos, macrófagos y mastocitos al área afectada y activan a los osteoclastos de la zona para iniciar el proceso de resorción ósea. De la misma forma y paralelo a esto, la activación del sistema del complemento específicamente de las fracciones solubles C3a y C5a atraen también más neutrófilos de la sangre hacia los tejidos afectados y estimulan la degranulación de los mastocitos y la síntesis de citocinas inflamatorias **[Kiss 2004]**.

En ésta fase de la periodontitis apical, las interleucinas son liberadas por los linfocitos y macrófagos entre estas: IL-1, IL-6, IL-8 y el FNT- α ; las acciones locales de éstas citocinas incluyen la potenciación de la adherencia de los leucocitos a las paredes endoteliales, la estimulación de los linfocitos, la potenciación de los neutrófilos, la activación de la producción de las PG y enzimas proteolíticas, la potenciación de la reabsorción ósea y la inhibición de la formación ósea **[Wisithphrom 2006]**.

Diferentes autores señalan que IL-2, también inhibe la síntesis de colágeno y la acción neutrófila, impidiendo el proceso de reparación en los tejidos e IL-1 induce y regula la degradación del colágeno y de la matriz extracelular por la actividad de metaloproteínasas de la matriz extracelular (MMPs) en los tejidos inflamados. Además, IL-2 estimula la expansión clonal de la población de linfocitos T CD4 y regula la secreción de otras citocinas proinflamatorias por parte de macrófagos y neutrófilos en la zona de la inflamación **[Byers 1990; Lepinski 2000; Heyeraas 1999]**.

Una vez liberadas en el área de la inflamación éstas citocinas van a estimular a las células clásticas: osteoclastos, dentinoclastos y cementoclastos respectivamente, para que segreguen ácidos los cuales van a descalcificar el tejido mineralizado de la zona y van a proporcionar el medio ácido adecuado para la acción de las enzimas proteolíticas, específicamente proteasas, colagenasas y

gelatinasas, las cuales van a degradar la estructura proteínica de una superficie previamente desmineralizada **[Soares 2002]**.

Sin embargo, si el avance de la respuesta inflamatoria aguda no es tratado, puede seguir diversas vías de evolución como el agravamiento con extensión en el hueso, la formación de un trayecto fistuloso buscando siempre la vía de menor resistencia o el paso a la cronicidad. La presencia continua de estos irritantes microbianos, hace que la lesión primaria dominada por los neutrófilos, se convierta de manera gradual en una lesión rica en macrófagos, linfocitos y células plasmáticas rodeadas por fibras de colágeno que constituyen a un granuloma apical **[Kumar 1999]**.

La formación de un granuloma o quiste periapical se da en la etapa crónica de la periodontitis apical, donde los macrófagos y fibroblastos conforman una barrera mecánica de defensa a nivel apical. Se presenta una formación de redes de colágeno por parte de los fibroblastos y la acción fagocitaria de los macrófagos para intentar delimitar el proceso, neutralizando la acción patógena de los microorganismos, de las toxinas bacterianas y/o de los restos necróticos pulpaes provenientes del conducto radicular **[Huang 1999]**. Si el granuloma apical sigue un patrón de evolución crónico, puede permanecer invariable y asintomático durante muchos años, incluso sin tratamiento, sin embargo en ocasiones el proceso inflamatorio crónico granulomatoso en el área apical puede originar otra forma de periodontitis apical conocida como quiste periapical **[Ingle 2004]**.

El quiste periapical es una respuesta inflamatoria crónica del periápice que se desarrolla a partir de lesiones crónicas con tejido granulomatoso preexistente, se caracteriza por la presencia de una cavidad central recubierta por epitelio y llena de líquido, rodeada por tejido granulomatoso y una cápsula fibrosa periférica. Por lo tanto, la formación de un quiste periapical dependerá de la existencia previa de un granuloma **[Ledesma-Montes 2004]**. Las células inmunocompetentes persistentes

en la luz del quiste proporcionan una fuente continua de prostaglandinas, citocinas proinflamatorias y quimiotácticas que pueden extenderse a través de la pared epitelial hacia los tejidos adyacentes; así mismo, la población celular residente en el área extraepitelial contiene numerosos linfocitos y macrófagos, los cuales también son capaces de producir una gran cantidad de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , PGE2, LTB4, FC) las cuales pueden activar a los osteoclastos, desarrollando la reabsorción ósea en la zona, y continuando el proceso de expansión quística **[Hahn 2007]**. Un mediador molecular observado en las lesiones perirradiculares crónicas es el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), es un factor quimiotáctico y mitogénico potente, estimula la proliferación y migración de células endoteliales, la angiogénesis, acelera la formación de tejido granulomatoso y promueve la mitosis de los fibroblastos.

Por su parte, los linfocitos y las células plasmáticas van a ser estimuladas por medio de los antígenos provenientes del conducto radicular produciendo una reacción de reconocimiento y la subsiguiente formación de complejos antígeno-anticuerpo que condicionan la respuesta inmunológica en ésta fase **[Anderson 2002; Farnoush 1984]**. En un granuloma apical, las células T son más numerosas que las células B. Las células B son necesarias para activar la respuesta humoral del proceso inflamatorio **[Trowbridge 2002]**. Por su parte los mastocitos activados liberan el contenido de sus gránulos en las lesiones granulomatosas; en pocas ocasiones los mastocitos se encuentran en el tejido pulpar normal, sin embargo, se encuentran de forma considerable en el tejido pulpar con inflamación crónica e incluso en lesiones como granulomas y quistes.

También, se ha determinado la presencia de inmunoglobulinas y complemento en las lesiones periapicales, siendo la más abundante la IgG seguida por la IgA y la IgE y también se determinó la presencia de C3 **[Kettering 1984; Craig 1991; Cymerman 1984]**. Por lo tanto, la periodontitis apical crónica representa un

balance dinámico entre agentes irritantes provenientes de la biopelícula intraconducto y los mecanismos de defensa del huésped que no pudieron eliminar los factores patogénicos. Los componentes estructurales de las lesiones periapicales, dependerá del balance entre los microorganismos y las defensas del huésped.

4. Relación de las lesiones endoperidontales

4.1. Anatomía e intercomunicaciones entre el conducto radicular y el periodonto

La relación entre la enfermedad periodontal y pulpar fue descrita por primera vez por Simring y Goldberg en 1964. Desde entonces, el término lesión "endo-perio" ha sido utilizado para describir las lesiones inflamatorias que se encuentran en distintos grados, tanto en el tejido pulpar como en el periodonto **[Simring 1964; Zehnder 2002]**.

La pulpa y el periodonto tienen interrelaciones embrionarias, anatómicas y funcionales. La pulpa se origina a partir de la papila dental y el ligamento periodontal lo hace a partir del folículo dental, ambos están separados por la vaina radicular epitelial de Hertwig.

Una vez que madura el diente y se forma la raíz, existen tres vías anatómicas principales de comunicación entre el tejido pulpar y el periodonto: los túbulos dentinarios sobre todo cuando el cemento se encuentra denudado, los conductos laterales y el foramen apical (que se explicaron con más detalle en los capítulos 2 y 3). Se ha sugerido la existencia de otras vías posibles de comunicación entre el tejido pulpar y el periodonto que llevan a la aparición de una interacción patológica en ambos tejidos. Estas posibles vías son la nerviosa, los surcos palatogingivales (incisivo lateral superior), el ligamento periodontal, el hueso alveolar y las vías comunes de drenaje vasculolinfático. Aunque la vía de comunicación más directa con el periodonto es el foramen apical, ello no implica que esta sea la única intercomunicación entre estos tejidos. Sobre todo en la zona apical y en la furcación de los molares, donde los conductos laterales y accesorios conectan al tejido pulpar con el ligamento periodontal. Existen otras vías de comunicación denominadas no

fisiológicas, que son causadas por iatrogenia (perforación del conducto radicular) [Pettersson 1985] y por fracturas radiculares verticales (traumatismo) [Chan 1999].

4.2. Clasificación de las lesiones endo-periodontales

Tradicionalmente las lesiones endo-periodontales se han clasificado de acuerdo a su etiología. La clasificación más utilizada fue dada por Simon, Glick y Frank en el año 1972, clasificando las patosis endo-periodontales en cinco tipos de lesiones [Simon 1972]:

- Lesiones endodónticas primarias: Son causadas frecuentemente por caries dental, procedimientos de restauración y lesiones por traumatismo. La influencia del tejido pulpar para infectar un periodonto sano se relaciona directamente con el contenido microbiano presente en el tejido pulpar necrótico y con el tiempo de exposición de los tejidos periapicales a estos microorganismos. Estas lesiones pueden dar como resultado una reabsorción ósea apical y lateral, así como una destrucción del ligamento periodontal [Raja 2008; Walton 2010].
- Lesiones endodónticas primaria con afectación secundaria del periodonto: Si algún trastorno endodóntico supurante primario no recibe tratamiento puede tener consecuencias secundarias y producir un deterioro periodontal. Una lesión periapical crónica en un diente con necrosis pulpar puede drenar coronalmente a través del ligamento periodontal hacia el surco gingival y puede simular un absceso periodontal agudo con formación de una seudobolsa. Una bolsa profunda y solitaria sin signos de enfermedad periodontal puede indicar la existencia de una lesión de origen endodóntico o de una fractura radicular vertical [Raja 2008; Walton 2010].
- Lesiones periodontales primarias: Se deben fundamentalmente a la acción de patógenos periodontales que avanzan en sentido apical por la superficie radicular. A menudo se observa una acumulación de placa dentobacteriana y

cálculo, las bolsas son más amplias y no se extienden necesariamente hacia el ápice [Raja 2008; Walton 2010].

- Lesiones periodontales primaria con afectación endodóntica secundaria: La pulpa puede necrosarse debido a que los microorganismos procedentes de la bolsa periodontal avanzan hasta alcanzar los conductos laterales, el foramen apical y los tejidos periapicales, invadiendo por estas vías el tejido pulpar. También como consecuencia del raspado y alisado radicular o intervenciones quirúrgicas con colgajo, los conductos laterales y los túbulos dentinarios pueden quedar expuestos al entorno bucal [Raja 2008; Walton 2010].
- Lesiones mixtas verdaderas: Cuando una lesión endodóntica avanza en sentido coronal y se une a una bolsa periodontal infectada que en sentido apical. En este tipo de lesiones se observa una pérdida de inserción periodontal y ósea muy severa.

Las infecciones pulpares y periodontales pueden ocurrir de manera independiente o simultánea en un mismo diente. La enfermedad periodontal primaria con afectación endodóntica secundaria y las lesiones mixtas verdaderas requieren un enfoque interdisciplinario, ya que clínicamente son indistinguibles.

4.3. Bacterias persistentes en los conductos radiculares y lesiones periapicales después del tratamiento endodóntico

La microbiota intraconducto y periapical de un diente obturado donde el tratamiento ha fallado, difiere marcadamente de la microbiota de los conductos radiculares infectados de dientes no tratados [Mohammadi 2013], como podemos observar en la (Tabla 7 y 8). Esta microbiota se compone de una menor cantidad de especies que la que se encuentra presente en las infecciones pulpares primarias y con un predominio de bacterias facultativas [Siqueira 2004; Sundqvist 1998]. Métodos de biología molecular han causado un gran impacto en el conocimiento de

la diversidad bacteriana presente en estas infecciones, como podemos observar en la **(Tabla9) [Subramanian 2009]**.

Los principales factores etiológicos de las infecciones periapicales persistentes o refractarias son los microorganismos que se quedan dentro de los túbulos dentinarios y conductos accesorios, siendo inaccesibles y resistentes a la desinfección y preparación biomecánica del conducto radicular durante el tratamiento. De igual manera, el tratamiento al realizarse se únicamente dentro del conducto los microorganismos que conforman la biopelícula periapical no son eliminados, esto podría explicar su persistencia y proliferación **[Noiri 2002]**.

También puede haber una inoculación y contaminación de otros microorganismos que no estaban presentes en la infección pulpar inicial. Se ha demostrado que los microorganismos por medio de la saliva pueden contaminar los conductos durante y después del tratamiento de conductos por una mala técnica aséptica o por una mala técnica de obturación y restauración **[Tronstad 1987; Ferreira 2004]**.

E. faecalis y *C. albicans*, son las especies más comúnmente encontradas en los conductos radiculares sometidos a un nuevo tratamiento endodóntico con infecciones persistentes. Al igual que *C. albicans*, *E. faecalis* tiene muchas características que hacen que sea un sobreviviente excepcional en el conducto radicular y en las infecciones periapicales como: vivir y persistir en el ambiente pobre en nutrientes, sobrevivir en la presencia de varios medicamentos (por ejemplo, hidróxido de calcio) e irrigantes (por ejemplo, hipoclorito de sodio), formar biopelícula en los conductos con medicación intraconducto, invadir y metabolizar los fluidos dentro de los túbulos de la dentina, adhesión al colágeno, sobrevivir en ambientes extremos con un pH bajo, alta salinidad y altas temperaturas. Se ha observado que *E. faecalis* en un medio rico en nutrientes y aeróbico forma una mayor cantidad de biopelícula pero con una menor organización, siendo más

proclive en este estado a invadir los túbulos dentinarios, mientras que, en un medio pobre en nutrientes la biopelícula presentaba un aumento de calcio y fósforo, así como una mayor degradación de la dentina que le rodeaban.

Por lo que se cree que, en estas circunstancias de supervivencia compleja, la biopelícula formada por microorganismos como *E. faecalis* tiende a calcificarse para aumentar sus defensas y ser aún más resistente, lo cual puede explicar por que esta bacteria contribuye en la persistencia de la infección periapical [Love 2001; Gopikrishna 2006].

Tabla 7. Especies bacterianas persistentes en los conductos radiculares.	
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Prevotella</i> sp.
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Propionibacterium</i> sp.
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
<i>Eubacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Olsenella uli</i>	<i>Streptococcus oralis</i>

sp: especies.

Tabla 8. Especies bacterianas presentes en las infecciones periapicales persistentes.

<i>Abiotrophia adiacens</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Denitrobacterium detoxificans</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>
<i>Acidovorax temperans</i>	<i>Dialister invisus</i>	<i>Selenomonas diana</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Selenomonas infelix</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>Actinomyces turicensis</i>	<i>Eubacterium minutum</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	<i>Eubacterium saphenum</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>
<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Filifactor alocis</i>	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Bergeriella denitrificans</i>	<i>Granulicatella elegans</i>	<i>Streptococcus hyointestinalis</i>
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Kingella oralis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Burkholderia anthina</i>	<i>Lonsdalea quercina</i> subsp. <i>quercina</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Methanobrevibacter oralis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Mogibacterium diversum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Campylobacter showae</i>	<i>Mogibacterium timidum</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Neisseria elongata</i>	<i>Streptococcus sinensis</i>
<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Neisseria flava</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Corynebacterium curtum</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Treponema socranskii</i> subsp. <i>socranskii</i>
<i>Corynebacterium durum</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema</i> sp.
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Propionibacterium propionicum</i>	<i>Veillonella atypica</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Veillonella caviae</i>

sp: especies, **subsp**: subespecie.

Tabla 9. Nuevas especies bacterianas presentes en infecciones periapicales persistentes identificadas por medio de técnicas moleculares.

<i>Abiotrophia</i> sp. oral clone P4PA_155	<i>Megasphaera</i> sp. oral clone BB166
<i>Actinomyces</i> genomosp. C1	<i>Megasphaera</i> sp. oral clone BS073
<i>Actinomyces</i> genomosp. C2	<i>Neisseria</i> sp. oral clone AP060
<i>Actinomyces</i> sp. oral clone AP064	<i>Neisseria</i> sp. oral clone AP085
<i>Actinomyces</i> sp. oral clone BL008	<i>Peptococcus</i> sp. oral clone MCE10_265 E1
<i>Actinomyces</i> sp. oral strain C29KA	<i>Peptostreptococcus</i> sp. MDA2346-2
<i>Alcaligenes</i> sp. STC1	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral clone BS044
<i>Atopobium</i> sp. oral clone C019	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral clone CK035
<i>Burkholderia</i> sp. 13	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral clone FG014
<i>Burkholderia</i> sp. CEB01056	<i>Prevotella</i> sp. oral clone IDR-CEC-0032
<i>Burkholderia</i> sp. M35B	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone AA024
<i>Campylobacter</i> sp. oral clone BB120	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone AJ036
<i>Capnocytophaga</i> sp. oral clone AA032	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone DY027
<i>Catonella</i> sp. oral clone AH153	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone EQ054
<i>Corynebacterium</i> sp. oral clone AK153	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone EW051a
<i>Desulfobulbus</i> sp. oral clone CH031	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone EW051a
<i>Desulfobulbus</i> sp. oral clone R004	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone EW084
<i>Dialister</i> sp. E2_20 E1 oral isolate	<i>Selenomonas</i> -like sp. oral clone CS015
<i>Dialister</i> sp. oral clone BS095	<i>Selenomonas</i> -like sp. oral strain GAA14
<i>Dialister</i> sp. oral strain GBA27	<i>Streptococcus</i> genomosp. C2
<i>Eubacteriaceae</i> oral clone P2PB_46 P3	<i>Streptococcus</i> genomosp. C3
<i>Eubacterium</i> sp. oral clone EH006	<i>Streptococcus</i> genomosp. C8
<i>Eubacterium</i> sp. oral clone IR009	<i>Streptococcus</i> sp. 2056B
<i>Eubacterium</i> sp. oral strain A35MT	<i>Streptococcus</i> sp. 3097C
<i>Firmicutes</i> sp. oral clone AO068	<i>Streptococcus</i> sp. 4093B
<i>Firmicutes</i> sp. oral clone CK057	<i>Streptococcus</i> sp. oral clone EK048
<i>Gemella</i> sp. oral strain C24KA	<i>Streptococcus</i> sp. oral strain 12F
<i>Kingella</i> sp. oral clone DE012	<i>Streptococcus</i> sp. oral strain B5SC
<i>Lachnospiraceae</i> genomosp. C1	<i>Streptococcus</i> sp. PSH2
<i>Lactobacillus</i> sp. KC45b	<i>Synergistes</i> sp. oral clone BH017
<i>Lactobacillus</i> sp. MF213	<i>Synergistes</i> sp. oral clone D084
<i>Lautropia</i> sp. oral clone FX006	<i>Synergistes</i> sp. oral clone W090
<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone BU064	<i>Veillonella</i> sp. oral clone BU083
<i>Megasphaera</i> genomosp. C1	<i>Veillonella</i> sp. oral clone X042

sp: especies, **subsp**: subespecie.

4.4. Transformación microbiana de la microbiota normal a patógena

La microbiota comensal bucal se compone de una gran diversidad de especies microbianas, las cuales se encuentran cubriendo todas las superficies que la constituyen. Estos microorganismos brindan protección impidiendo la multiplicación, establecimiento e invasión de microorganismos potencialmente patógenos **[Metwalli 2013]**.

Esta microbiota comensal, ha coevolucionado con su huésped y ha adquirido los medios para sobrevivir y tolerar mecanismos de defensa de este, sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio en este ambiente complejo, se presentara el cambio de un estado de salud a un estado de enfermedad. Estos cambios permitirán que cierta población microbiana aumente volviéndose patógena para el huésped, contribuyendo al comienzo y progresión de las patologías orales más comunes como la caries dental y la enfermedad periodontal **[Kuboniwa 2012]**, así como de todas aquellas que se derivan de estas.

El equilibrio que hay entre la microbiota comensal y el huésped puede ser alterado cuando se ve comprometido el sistema inmune del huésped, cuando un microorganismo comensal se encuentra fuera de su nicho ecológico específico o cuando los microorganismos invasores cuentan con una capacidad patógena para desarrollar una enfermedad. Los microorganismos patógenos pueden ser bacterias, hongos, virus y protozoos que tienen la capacidad de adherirse, colonizar, sobrevivir, multiplicarse y al mismo tiempo evitar los mecanismos de defensa del huésped. Como se explicó anteriormente, estos microorganismos pueden causar la destrucción del tejido de manera directa o indirecta. El daño directo a los tejidos puede ser inducido por medio de los factores de virulencia y los metabolitos microbianos, por otro lado, el daño tisular indirecto puede presentarse a partir de la respuesta inmune del huésped, induciendo o inhibiendo las funciones de las células inmunológicas.

V. Discusión

Dentro de la cavidad bucal se han encontrado más de 700 especies bacterianas, además de otros microorganismos como hongos, virus e inclusive arqueas, de los cuales la mayoría forma parte de la microbiota comensal. Así mismo, encontramos dentro de la cavidad oral, una gran diversidad de nichos ecológicos y nutrientes que sin duda son propicios para la formación de biopelículas [Dewhirst 2010; Jenkinson 2005]. De ahí la inquietud para estudiar las características de nichos en particular que llevan al desarrollo de infecciones de importancia odontológica como son las infecciones periapicales.

En las infecciones pulpares se ha observado una menor diversidad de microorganismos en comparación con la microbiota oral y se caracteriza por un predominio de bacterias anaerobias estrictas [Brito 2007; Siqueira 2009; Tavares 2011]. Un conducto radicular con tejido pulpar necrótico constituye un espacio ideal para la colonización bacteriana, ya que les proporcionan un entorno adecuado para la formación de la biopelícula intraconducto. La biopelícula intraconducto se desarrollará sobre las paredes dentinarias del conducto radicular y adicionalmente estos microorganismos pueden invadir la entrada de los conductos accesorios y los túbulos dentinarios. Lo que podemos enfatizar de esta información, es que el conducto radicular es ideal para el crecimiento de microorganismos que pueden sobrevivir bajo condiciones extremas, en donde estarán sometidos a modificaciones ambientales (pH, temperatura, O₂ reducido, etc.) y con pocos nutrientes.

Conforme avance el proceso infeccioso dentro del conducto radicular los microorganismos se extenderán hacia la porción más apical del diente, comenzando de esta manera la colonización, invasión e infección de los tejidos periapicales [Walton 2010]. De este modo, cada uno de los microorganismos que tuvieron la capacidad de superar los mecanismos de defensa del huésped en la cercanía del

foramen apical, podrán prosperar en el tejido periapical inflamado, colonizar este nuevo nicho y formar una biopelícula fuera del conducto radicular.

La biopelícula extrarradicular, es la que se forma sobre el cemento perirradicular, en este caso sobre la región priapical donde existen zonas de reabsorción del cemento apical **[Frank 2006]**. Este tipo de biopelícula se ha encontrado relacionada con las infecciones periapicales crónicas y persistentes **[Harn 1998]**. También se ha observado que en la región periapical, el establecimiento de los microorganismos en los tejidos periapicales puede darse por su adhesión a la superficie del ápice radicular en un inicio en forma de estructuras similares a una biopelícula o dentro del cuerpo de la lesión inflamatoria como colonias cohesivas **[Jacinto 2005]**. Sin embargo, la literatura es controversial en cuanto a considerar si es propiamente una biopelícula madura, o sólo adhesión bacteriana. Se enfatiza además que todo este proceso da inicio antes de que haya lesiones establecidas en tejidos de soporte del diente, como serían el cemento radicular y periodonto.

La severidad de una infección periapical estará determinada por los microorganismos y sus interrelaciones dentro de la biopelícula intraconducto **[Kesavalu 1998]**, de igual manera, también influirán el balance entre los microorganismos y las defensas del huésped. Dependiendo de la duración de la inflamación, efectividad en la respuesta inmune del hospedero y de la susceptibilidad sistémica del mismo para responder ante infecciones, es que se establecerá la severidad de la lesión en los tejidos periapicales.

Las patologías periapicales pueden cursar por una respuesta de inflamación leve, hasta una destrucción extensa de los tejidos **[Walton 2010]**. También debemos enfatizar que dependiendo de esta respuesta inflamatoria, el sistema inmunológico del propio individuo va a ser el que se encargará de desarrollar mecanismos de defensa que contribuyan a la destrucción del tejido periapical. No

siendo la respuesta bacteriana la responsable directa de esta destrucción, como lo reporta la literatura mencionada en el presente trabajo.

Retomando el concepto de biopelícula, que es un modo de crecimiento microbiano complejo y organizado donde los microorganismos interactúan de manera dinámica entre sí **[Flemming 2010]**, es de suma importancia poder distinguir si los microorganismos que colonizan el periápice, se encuentran formando dicha estructura. Sin embargo en la literatura no ha quedado bien claro este concepto.

El ejemplo más común de biopelícula en cavidad oral, es el de la placa dentobacteriana, que se forma sobre la superficie dental **[Donlan 2002]**. Como sabemos, la placa dentobacteriana es considerada el agente etiológico de las patologías orales más frecuentes que son la caries y las enfermedades periodontales **[Marsh 2011]**, las cuales a su vez, pueden diseminarse y provocar otras patologías como son las infecciones pulpares y periapicales.

Por lo tanto, podemos concluir que el principal agente etiológico de las infecciones endo-periodontales son los microorganismos propios de la placa dentobacteriana. Siendo este el motivo por el cual los estudios principales de biopelícula intraconducto e infecciones periapicales, estarán siempre en estrecha relación con los estudios de biopelículas de placa dentobacteriana.

VI. Conclusiones

Ciertos microorganismos tienen la capacidad de dar inicio a la formación de las biopelículas, el cual es un mecanismo que les permite sobrevivir y adaptarse a nichos específicos de la cavidad oral, así como protegerse de la respuesta inmune del huésped al estar en equilibrio con el mismo. Sin embargo, no los excluye de poder tener mecanismos de patogenicidad en el huésped.

Recientemente, el avance y aplicación de nuevas técnicas moleculares, han permitido la identificación de un mayor número de microorganismos presentes en las infecciones pulpares y periapicales, dicho conocimiento, puede guiarnos al entendimiento del inicio y progresión de las infecciones pulpares y periapicales.

Como se pudo observar en esta revisión bibliográfica, la participación que tienen los microorganismos en la inducción del proceso inflamatorio del huésped, ha sido ampliamente reportado, sin embargo, a pesar de que esta respuesta depende de la microbiota, aún no se tiene información suficiente de la composición de la biopelícula observada en intraconducto y en el periápice.

Finalmente, estas investigaciones en el campo de la microbiología, tienen que ser más desarrolladas, para a futuro pueda ser posible estudiar las biopelículas con mejor detalle, y su estudio permita la aplicación de coadyuvantes antimicrobianos en la terapia endodóntica y periodontal, que ayude a la eliminación total de la microbiota intraconducto y evitar fracasos endodónticos.

VII. Referencias bibliográficas

1. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol 2008; 46:1407-1417.
2. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi-a review. Med Mycol 2012; 50:337-45.
3. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A and Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol Lett. 1998 Oct 15; 167(2):179-84.
4. Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE, et al. The hyphal-associated adhesion and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. PLoS Pathog 2008; 4:e1000217.
5. Anderson L, Dumsha T, McDonal N, Spitznagel J. Evaluating IL-2 levels in human pulp tissue. J Endod 2002;28(9):651-655.
6. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. Microbiol Rev 1995;59:646-72.
7. Bagg, J., and R. W. Silverwood. 1986. Coagglutination reactions between. *Candida albicans* and oral bacteria. J. Med. Microbiol. 22:165–169.
8. Bammann LL, Estrela C. Microbiological aspects in endodontics. Endodontic Science 2009. Vol 1; edition 2:258-81.
9. Barnes AM., Ballering KS, Leibman RS, Wells CL and Dunny, G.M. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. MBio. 2012 Jul 24; 3(4):e00193-12.
10. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. J Endod 1981; 7(3): 100-4.
11. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat Rev Genet 2002; 3:918-30.
12. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J Bacteriol 1999; 181:4725-33.

13. Blango MG and Mulvey MA. Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. Curr Opin Microbiol. 2009 Apr; 12(2):177-81.
14. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physical-chemistry of initial microbial adhesive interaction its mechanisms and methods of study. FEMS Microbiol Rev 1999; 23: 179-230.
15. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res 2011; 45:69-86.
16. Brand A, Shanks S, Duncan VM, Yang M, Mackenzie K, Gow NA. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. Curr Biol 2007; 17:347-52.
17. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol 2005; 13:20-26.
18. Brito LC, Teles FR, Teles RP, França EC, Ribeiro-Sobrinho AP, Haffajee AD, Socransky SS. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):3039-49. Epub 2007 Jul 18.
19. Brito LC1, Sobrinho AP, Teles RP, Socransky SS, Haffajee AD, Vieira LQ, Teles FR. Microbiologic profile of endodontic infections from HIV- and HIV+ patients using multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization. Oral Dis. 2012 Sep;18(6):558-67.
20. Brogden KM, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial diseases. Washington: ASM Press 2008.
21. Byers M, Taylor P, Khazat B, Kimberly C. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. J Endod 1990; 16(2): 78-84
22. Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S and Korber DR. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. Adv Dent Res. 1997; 11:4-13.
23. Carranza F., Newman M. Periodontología Clínica. 9na. Edición. Mexico: Ediciones Mc Graw- Hill Interamericana. Mexico. Pp. 134-169.

24. Castrillón RLE, Palma RA, Padilla DC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. Dermatología Rev Mex. 2010;54:14-24.
25. Castrillón RLE, Palma RA, Padilla DMC. Biopelículas fúngicas. Dermatol Rev Mex 2013; 57:350-361.
26. Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin M, Munoz H. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. Int Endod J 2006; 39:394-400.
27. Chaffin WL, Lo´pez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Mart´ınez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62:130-80.
28. Chan, C.-P., Lin, C.-P., Tseng, S.-C. & Jeng, J.-H. Vertical root fracture in endodontically versus nonendodontically treated teeth. A survey of 315 cases in Chinese patients. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 1999; 87, 504–507.
29. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:5048-52.
30. Cisar, J. O., P. E. Kolenbrander, and F. C. McIntire. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. Infect. Immun. 1979; 24:742–752.
31. Cogoni, V., Morgan-Smith, A., Fenno, J.C., Jenkinson, H.F. and Dymock, D. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase (CTLP) integrates spirochaetes within oral microbial communities. Microbiology 2012; 158: 759–770.
32. Cohen J. Mechanisms of tissue injury in sepsis: Contrasts between gram positive and gram negative infection. J Chemother 2001;13:153-8.
33. Cohen S, Hargreaves KM. Cohen Vías de la pulpa. 10a ed. Barcelona; México, Elsevier España, 2011.
34. Cook, G. S., J. W. Costerton, et al. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. J Periodontal Res 1998; 33(6): 323-7.
35. Cortes J, Torabinejad M, Rodriguez A, Gomez E. Presence of secretory IgA in human periapical lesions. J Endod 1994; 20(2): 87-9

36. Cortés LAJ, Russi NJA. Equinocandinas. Rev Chil Infect 2011;28:529-536.
37. Costerton JW and Lappin-Scott HM. Introduction to microbial biofilms. Microbial biofilm. 1995; p: 1-11. Cambridge University Press. Cambridge.
38. Costerton JW, Geesey GG and Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am. 1978; 238: 86-95.
39. Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP. Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections. Science. 1999; 284:1318-22.
40. Costerton, JW, Geesey GG, and Cheng GK. How bacteria stick. Sci. Am, 1978; 238:86-95.
41. Cowan M, Taylor KG and Doyle RJ. Energetics of the initial phase of adhesion of Streptococcus sanguis to hydroxyapatite. J Bacteriol.1987; 169:2995-3000.
42. Craig J, Bakland L, Sugita E. Microbiología de la endodoncia y asepsia en la práctica endodóntica. En: Ingle J, Bakland L, editores. Endodoncia. México. McGraw-Hill Interamericana, 2003: 63-93.
43. Craig J, Falkler W. Detection of immunoglobulins from explant cultures of periapical lesions. J Endod 1991; 17(3): 105-10
44. Cross SE, Kreth J, Zhu L, Sullivan R, Shi W, Qi F, et al. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of Streptococcus mutans probed by atomic force microscopy under in situ conditions. Microbiology. 2007; 153(Pt 9):3124-3132.
45. Cymerman J, Cymerman D, Walters J, Nevins A. Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. J Endod 1984; 10(1): 9-11.
46. Dahlen G, Moller A Jr. Microbiology of endodontic infection. In: Slots J, Taubman MA, editors. Contemporary Oral Microbiology and immunology. St.Louis: Mosby year Book Inc: 1991. p. 444-55.
47. Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of Candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell Microbiol 2010; 12:248-71.
48. Davey ME and. O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000; p. 847-867, December Vol. 64, No. 4, 1092-2172.

49. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW and Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 1998 Apr 10; 280(5361):295-8.
50. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, et al. The human oral microbiome. J Bacteriol 2010; 192: 5002–5017.
51. Donlan RM and Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. 2002. Rev.; 15, 167–193.
52. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002; 8 (9): 881-90.
53. Eidelman D, Neuman I, Kuttin ES, Pinto M, Beemer AM. Dental sepsis due to *Candida albicans* causing urticaria: case report. Ann Allerg 1978; 41:179-181.
54. failure. Int Endod J 2001;34:399-405.
55. Falcioni GC, Coderoni S, Tedeschi GG, Brunori M, Rotilio G. Red cell lysis induced by microorganisms as a case of superoxide and hydrogen peroxide dependent hemolysis mediated by oxyhemoglobin. Biochim Biophys Acta 1981;678:437-41.
56. Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. J Endod 1984; 10(6): 250-52
57. Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. International Endodontic Journal 2004; 37, 61–9.
58. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9:109-18.
59. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep; 8(9):623-33.
60. Fonzi WA. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper crosslinking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. J Bacteriol 1999; 181:7070-9.
61. Frank SA, Barbour AG. Within-host dynamics of antigenic variation. Infect Genet Evol 2006;6:141-6.
62. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. PLoS One 2011; 6:e17632.

63. Genco, R.; Golman, H.; Cohen, D. Periodoncia. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. México. 1993. Pp. 325-331.
64. George, K. S., and W. A. Falkler, Jr. Coaggregation studies of the *Eubacterium* species. Oral Microbiol. Immunol. 1992; 7:285–290.
65. Gibbons, R. and M. Nygaard. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. Arch Oral Biol 1970; 15(12): 1397-400.
66. Gomes C1, Fidel S, Fidel R, de Moura Sarquis MI. Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections. J Endod. 2010 Apr;36(4):626-9.
67. Gopikrishna AV, Kandaswamy D, Jeyavel RK. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of five endodontic root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. J Conserv Dent 2006;9:2-12.
68. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. Appl Environ Microbiol 2011; 77:6357-6367.
69. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. PLoS One 2012; 7:e47722.
70. Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 1994; 5: 78–111.
71. Hahn C, Falkler W, Siegel M. A study of T and B cells in pulpal pathosis. J Endod 1989; 15(1): 20-6
72. Hahn C, Liewehr F. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. J Endod 2007; 33: 213-19
73. Hahn Ch, Best AI, Tew J. Comparasion of type 1 y tipo 2 citokine production by mononuclear cells cultured with *Streptococcus mutans* and selected other caries bacteria. J Endod 2004;30(5):333-338.
74. Hall, R.A., Turner, K.J., Chaloupka, J. et al. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2011;10: 1034–1042.

75. Harding WM, Marques LLR, Howard JR, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? Trends Microbiol 2009;17:475-480.
76. Harn WM, Chen YH, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. Endod Dent Traumatol 1998;14:237-40.
77. He, X., Hu, W., Kaplan, C.W., Guo, L., Shi, W. and Lux, R. Adherence to streptococci facilitates *Fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community. Microb Ecol 2012; 63: 532–542.
78. Heyeraas K, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10(3):328.
79. Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. Infect Immun 1995;63:1827-34.
80. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992; 74:648-51.
81. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol 2001; 67:2982-92.
82. Hornef M, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol 2002;113:1033-40.
83. Huang G, Potente A, Kim J, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol 1999; 88(2): 214-20
84. Ikegami, A., Honma, K., Sharma, A. and Kuramitsu, H.K. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. Infect Immun 2004; 72:4619–4627.
85. Ingle J, Simon J, Walton R, Pashley D, Bakland L, Heithersay G, et al. Patología pulpar: etiología y prevención. En Ingle J, Bakland L, editores. Endodoncia. 5ta edición. México. Mc Graw Hill Interamericana, 2004: 95-175.
86. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol 2005;54:777-83

87. Jansen A, Yu J. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:138-42.
88. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? Review. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jul 15;236(2):163-73.
89. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of Streptococcus sanguis and other streptococci with Candida albicans. *Infect Immun* 1990;58:1429-36.
90. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 2005; 13: 589–595.
91. Jenkinson, H.F. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 2011; 13: 3077–3087.
92. Joint I, Downie JA and Williams P. Bacterial conversations: Talking listening and eavesdropping. An introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1115-7.
93. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
94. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. Virulence of a polymicrobial complex, Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis, in a murine model. *Oral Microbiol. Immunol.* 1998; 13:373–377.
95. Kettering J, Torabinejad M. Concentrations of Immune Complexes, IgG, IgM, IgE, And C3 in Patients with Acute Apical Abscesses. *J Endod* 1984; 10(9):417-21
96. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:587-93.
97. Khemaleelakul S1, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):312-8. Epub 2006 Feb 17.
98. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83: C35–C38.

99. Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. Infect Immun 1989;57:3425-33.
100. Kiss, C. Cell to Cell. Endodontic Topics 2004;8:88-103.
101. Klein MI, Falsetta ML, Xiao J, Bowen WH, Koo H. The role of extracellular polysaccharides matrix in virulent oral biofilms. In: Oral microbial ecology: current research and new perspectives. Jakubovics NS, Palmer RJ Jr, editors. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2013.
102. Kolenbrander PE, Anerson RX, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, et al. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66: 486–505.
103. Kolenbrander, P. E., and R. N. Andersen. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. Infect. Immun. 1989;57:3204–3209.
104. Kolenbrander, P. E., R. N. Anderson, and L. V. H. Moore. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas fluegei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena*, with strains from 11 genera of oral bacteria. Infect. Immun. 1989; 57:3194–3203.
105. Kolenbrander, P., R. Andersen, et al. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Eastman Dental Institute, University College London 1999; 171-186.
106. Kolenbrander, P.; Phucas, C. Effect of saliva on coaggregation of *Actynomices* and *Streptococcus* species. Infect Immun 1984; 44: 228 - 233.
107. Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S. and Palmer, R.J. Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66:486–505.
108. Kolenbrander, P.E., Parrish, K.D., Andersen, R.N. and Greenberg, E.P. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. Infect Immun 1995; 63: 4584–4588.
109. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res. 2013 Dec; 92(12):1065-73.

110. Kreth, J., Zhang, Y. and Herzberg, M.C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2008; 190:4632–4640.
111. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, et al. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. Expert Rev Proteomics 2012; 9: 311–323.
112. Kuboniwa, M. and Lamont, R.J. Subgingival biofilm formation. Periodontol 2010; 52: 38–52.
113. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the hostpathogen interaction. Genes Dev 2005;19:2645-55.
114. Kumamoto CA. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. Nat Rev Microbiol 2008; 6:667-73.
115. Kumar R, Chhibber S, Harjai K. Quorum sensing is necessary for the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. Kidney Int 2009;76:286-92.
116. Kumar V, Contran R, Robbins, S. Inflamación aguda y crónica. En Kumar V y Contran R, editores. Patología Humana. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid-España. 1999:27-50.
117. Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Yonezawa H, Ochiai K, Yamamoto M. Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;47:67-74.
118. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28 (2): 163-175.
119. Ledesma-Montes C, Garces-Ortiz M, Rosales-Garcia G, Hernandez-Guerrero JC. Importance of Mast Cells in Human Periapical Inflammatory Lesions. J Endod 2004;30:855.
120. Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR and Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-c-mediated macrophage killing. J Immunol. 2005 Dec 1; 175(11):7512-8.
121. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio C. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod 2002;28:815-8.

122. Lepinski A, Hargreaves K, Goodis H, Bowles W. Bradykinin Levels in Dental Pulp by Microdialysis. J Endod 2000; 26(12): 744-47
123. Liébana, J. Microbiología Oral. 2da. Edición, España: Mc Graw-Hill Interamericana. 2002. Pp. 515-525, 541-559, 561-617.
124. Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: Microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis 2002;2:156-62.
125. Love RM. Enterococcus faecalis-a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001 Jul;34(5):399-405.
126. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock Biología de los microorganismos. 12va ed. Madrid España, Ed. Pearson Adison Wesley: 2009. Pp. 304-347.
127. Maita E, Horiuchi H. Polyamine analysis of infected root canal contents related to clinical symptoms. Endod Dent Traumatol 1990;6:213-7.
128. Marsh P, Martin M. Oral Microbiology. 5th edition. Wright. England.2011. Pp. 8-74.
129. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res 1994;8(2):263-71.
130. Marshall. Correlation of clinical tests with microscopic pathology of the dental pulp. J Dent Res 1970; 16(4):267-78.
131. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-28.
132. Mayer FL, Wilson D, Jacobsen ID, Miramón P, Große K, Hube B. The novel Candida albicans transporter Dur31 is a multi-stage pathogenicity factor. PLoS Pathog 2012; 8:e1002592.
133. Metwalli KH1, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003616.
134. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. Biomed J. 2013 Mar-Apr;36(2):59-70.
135. Mousavi S, Talebi A, Kianoosh S. Immunohistochemical Assessment of Natural Killer Cells in Normal and Inflamed Dental Pulps. JRMS 2006; 11(2): 119-121.

136. Mudie A, Holland G. Local Opioides in the Inflamed Dental Pulp. J Endod 2006; 32: 319-23
137. Mühlshlegel FA, Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. Mol Cell Biol 1997; 17:5960-7.
138. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL, et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. PLoS One 2012; 7:e33362.
139. Myhre AE, Aasen AO, Thiemermann C, Wang JE. Peptidoglycan – a endotoxin in its own right? Shock 2006;25:227-35.
140. Nair P. Apical periodontitis: A dynamic encounter between root canal infection and host response. Periodontol 2000 1997;13:121-48.
141. Nair PN. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. J Endod 1987;13:29-39.
142. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Med 2004;15:348–81.
143. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. J Conserv Dent. 2010 Oct;13(4):233-9.
144. Nastri N, Nastri M, Jewtuchowicz V, Mujica M, Lovanniti C, Gualtieri A, Ponton J, Rosa A. Prevalence of *Candida* species in necrotic pulp with chronic periapical processes. Acta Odontol Latinoam. 2011;24(2):183-7.
145. Nazar JC. Biofilms bacterianos. Revisión bibliográfica. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. 2007; 67: 61-72.
146. Negroni M. Microbiología estomatológica. 2da ed. Argentina, Ed. Médica Panamericana: 2009. Capítulo 20. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales.
147. Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L, Peck SC, Brown AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. Fungal Genet Biol. 2011; 48:297-305.
148. Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short chain carboxylic acid Stimulated, PMN – mediated gingival inflammation. Crit Rev Oral Biol Med 1997;8:269-90.

149. Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. PLoS Biol 2009; 7:e1000133.
150. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesion function in *Candida albicans* biofilm formation. Curr Biol 2008; 18:1017-24.
151. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. J Endod 2002;28:679-83.
152. Odds FC. *Candida* and Candidosis. second ed. Bailliere Tindall, London, United Kingdom, 1988.
153. Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. Crit Rev Biotechnol 1993;13:1-55.
154. Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Takeuchi K, Hoshino M, Takano Y, Maeda T. Pulpal Regeneration after Cavity Preparation, with Special Reference to Close Relationships Between Odontoblasts and Immunocompetent Cells. Microsc Res Tech 2003;60(5):483&endash;90.
155. Orstavik D. Medicación Intraconducto. En: Pitt Ford J, editores. Endodoncia en la práctica clínica. México. McGraw-Hill Interamericana, 1999: 106-22.
156. O'Toole G, Kaplan HB and Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000; 54:49-79.
157. Palmer CA, Kent R Jr, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. J Dent Res 2010;89:1224-1229.
158. Palmer, R.J. Jr, Kazmerzak, K., Hansen, M.C. and Kolenbrander, P.E. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. Infect Immun 2001; 69: 5794–5804.
159. Pammi, M., Liang, R., Hicks, J.M., Barrish, J. and Versalovic, J. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. Pediatr Res 2011; 70: 578–583.
160. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:8789-93.

161. Perisasamy, S. and Kolenbrander, P.E. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. J Bacteriol 2010; 192: 2965–2972.
162. Petersson, K., Söderström, C., Kiani-Anaraki, M. & Le'vy, G. Evaluation of the ability of thermal and electrical tests to register pulp vitality. Endodontics and Dental Traumatology 1999; 15, 127–131.
163. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20:133-63.
164. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. PLoS Biol 2007; 5:e64.
165. Prats G. Microbiología clínica. 1ra ed. Buenos Aires, Madrid.Ed. Médica Panamericana. 2005. Capítulo5. Micología.
166. Prosser JL. Quorum sensing in biofilms. In: Newman HN, Wilson M, ed. Dental plaque revisited. Gardiff: Bioline,1999:79-88.
167. Pumarola J, Canalda C. Patología de la pulpa y el periápice. En: Canalda C, Brau E, editores. Endodoncia. Técnicas clínicas y Bases científicas. Barcelona, España. Editorial Masson, 2001; pag:56-69.
168. Qin Z, Ou Y, Yang L. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 2007;153:2083-92.
169. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J CUn Periodontoi 1995: 22: 1-14.
170. Raja Sunitha V, Pamela Emmadi, Ambalavanan Namasivayam, Ramakrishnan Thyegarajan, and Vijayalakshmi Rajaraman. The periodontal – endodontic continuum: A review. J Conserv Dent. 2008 Apr-Jun; 11(2): 54–62.
171. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Sci Am 1992;267:54–61.
172. Roberto M, Comelli R. Alteraciones pulpares. Semiología, diagnóstico clínico e indicaciones de tratamiento. En: Leonardo M, Leal J, editores. Endodoncia. Tratamiento de los conductos radiculares. 2da edición. Buenos Aires. Editorial Médica-panamericana, 1994: 32-43.

173. Roberts AP and Mullany, P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Dec;8(12):1441-50.
174. Roberts SK, Bass C, Brading M, Lappin-Scott H, Stoodley P. Biofilm information and structure: what's new? In: NewmanHN, Wilson M, ed. Dental plaque revisited. Cardiff:BioUne, 1999: 15-35.
175. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 2008;46:3599–606.
176. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. J Endod. 2011 Sep;37(9):1206-12.
177. Rodriguez Ponce. Endodoncia. Consideraciones actuales.Actualidades médico dontológicas Latinoamericana. C.A. Caracas, 2003; pag.209-19.
178. Sauer K, Camper, AK, Ehrlich GD, Costerton JW and Davies DG. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002 Feb; 184(4):1140-54.
179. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of Candida albicans during infection. Eukaryot Cell 2003; 2:1053-60.
180. Seltzer S. Classification of pulpal pathosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1972 Aug; 34(2):269-87.
181. Seltzer, Bender. La pulpa dental.Consideraciones biológicas en los procedimientos odontológicos. Editorial Mundi. Filadelfia, 1970; pág:269-80.
182. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995;11:6-9.
183. Sharma, A., Inagaki, S., Sigurdson, W. and Kuramitsu, H.K. Synergy between Tannerella forsythia and Fusobacterium nucleatum in biofilm formation. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 39–42.
184. Simon JH, Glick DH, Frank AL. The relationship of endodontic-periodontic lesions. Journal of periodontology 1972 April; 43(4)202-208.
185. Simring, M. & Goldberg, M. The pulpal pocket approach: Retrograde periodontitis. Journal of Periodontology 1964; 35,22–48.

186. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. J Oral Microbiol. 2009 Aug 10;1. doi: 10.3402/jom.v1i0.2009.
187. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res 2009; 88: 969–981.
188. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3314-9.
189. Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 May;97(5):632-41.
190. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. Clin Microbiol Rev. 2013 Apr;26(2):255-73.
191. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod 2008;34:1291-301.
192. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res 2012; 91:1110-1118.
193. Siqueira, J. F., Jr., and I. N. Rôças. 2004. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 97:85–94.
194. Slots, J; Taubma, M. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1ed. St. Louis USA. Editorial Mosby. 1992. Pp. 283-298.
195. Soares I y Golgber F. Resorciones dentarias en Endodoncia. Técnica y fundamentos. Médica Panamericana. Argentina. 2002;291-316.
196. Socransky SS, Haffajee D. Microbiology of periodontal disease. In Clinical Periodontology and Implant Dentistry (3th ed). Copenhagen: Munksgaard, 1997; 138-188.
197. Soll DR. Why does *Candida albicans* switch? FEMS Yeast Res 2009; 9:973-89.
198. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science 1999; 283:1535-8.

199. Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. Mycoses 2007; 50:1-12.
200. Stashenko P, Teles R. Periapical Inflammatory Responses and their Modulation. Crit Rev Oral Biol Med 1998; 9(4): 498-521
201. Subramanian K1, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. J Endod. 2009 Jul;35(7):950-7.
202. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004; 12:317-24.
203. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented bacteroides. J Med Microbiol 1985;19:85-94.
204. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Endodontic Topics. 2003;(6): 3-28.
205. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Odontological Dissertation no.7. Umea, Sweden: University of Umea; 1976.
206. Sundqvist, G., D. Figdor, S. Persson, and U. Sjögren. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 1998.85:86–93.
207. Sundqvist, G. Pathogenicity and virulence of Black Pigmented Gram negatives anaerobes. Immunol Med Microbiol 1993; 6: 125 - 138.
208. Sundstrom P, Balish E, Allen CM. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. J Infect Dis 2002; 185:521-30.
209. Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. Cell Microbiol 2002; 4:461-9.
210. Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AM, Salmond GP and Williams P. Quorum sensing as a population-dependent determinant of bacterial physiology. Adv Microb Physiol. 2001; 45: 199-270.
211. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. PLoS Pathog 2012; 8:e1002848.

212. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res 2011; 90:294-303.
213. Takahashi, N. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 109–113.
214. Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Chan KY, Luo G, Fang HH. Direct detection of cell surface interactive forces of sessile, fimbriated and nonfimbriated *Actinomyces* spp. using atomic force microscopy. Arch Oral Biol 2004;49:727-38.
215. Tavares WL, Neves de Brito LC, Teles RP et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA–DNA hybridization. Int Endod J 2011; 44: 225–235.
216. Thomas JG and Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc. 2006; 137(suppl): 10S-15S.
217. Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, Thurlow L, Tomich J, Hancock LE. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol 2009; 72:1022-36.
218. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka S. Regulation of Interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. J Endod 2001;27(4):273-277.
219. Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, Ike Y. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone – responsive conjugative plasmid pPDI. J Bacteriol 1997;179:7843-55.
220. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. Endod Dent Traumatol 1990;6:73-7.
221. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. Endodontics & Dental Traumatology 1987; 3, 86–90.
222. Trowbridge H. Histology of pulpal inflammation. En: Seltzer and Benders Dental Pulp. Hargreaves K, Goodis H, editors. Quintessence publishing Co, Inc, 2002:227-45.
223. Trowbridge H. Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. J Endod 1981 Feb;7(2):52-9.

224. van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G., van der Reijden, W.A. and van der Velden, U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1023–1028.
225. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006; 60:5-15.
226. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:1274-87.
227. Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio* 2011; 2:e00055-11.
228. Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* 2011; 6:e17046.
229. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):128-37.
230. Walton RE, Torabinejad M. Endodoncia : principios y práctica . 4ta ed. Barcelona, España : Elsevier, 2010.
231. Wang CY, Stashenko P. Thirole of interleukin-1 in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system oral. *Microbiol Immunol* 1993, Feb. 8(1) 50-6.
232. Wang JE, Jorgensen PF, Almlöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6) and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* 2000;68:3965-70.
233. Wang JE, Jorgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, et al. Peptidoglycan primes for LPS – induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 2001;16:178-82.
234. Watnick P and Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000 may.;182(10):2675-9.

235. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 2002; 295:1487.
236. Whitmore, S.E. and Lamont, R.J. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. Mol Microbiol 2011; 81: 305–314.
237. Wilson, M.; Reddi, K.; Henderson, B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res 1996;31:393-407.
238. Wisithphrom K, Windsor J. The effects of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1, Interleukin-6, and Transforming Growth Factor on pulp fibroblast mediated collagen degradation. J Endod 2006;32:853-861.
239. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. Mol Oral Microbiol. 2013 Apr; 28(2):83-101.
240. Xie Z, Thompson A, Sobue T, Kashleva H, Xu H, Vasilakos J, et al. Candida albicans biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. J Infect Dis 2012; In press; PMID:23033146; <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis607>.
241. Xu, X.L., Lee, R.T., Fang, H.M. et al. Bacterial peptidoglycan triggers Candida albicans hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. Cell Host Microbe 2008;4: 28–39.
242. Yamasaki M, Morimoto T, Tsuji M, Akihiro I, Maekawa Y, Nakamura H. Role of IL-2 and Helper T-Lymphocytes in Limiting Periapical Pathosis. J Endod 2006; 32:24.
243. Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. J Clin Periodontol. 2002 Aug;29(8):663-71.
244. Zhu W, Filler SG. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. Cell Microbiol 2010; 12:273-82.
245. Zordan R, Cormack B. Adhesins on opportunistic fungal pathogens. In: Calderone RA, Clancy CJ, ed. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC, 2012. Pp. 243-259.