



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DESCRIPCIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE
CONDUCTOS RADICULARES CON NECROSIS PULPAR SIN
LESIÓN PERIAPICAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

DANIELA FLORES ARELLANO

TUTORA: Dra. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE

ASESORES: Dra. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ
Esp. GUSTAVO FRANCISCO ARGÜELLO REGALADO

MÉXICO, Cd. Mx.

2022



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.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
DEDICATORIA	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	6
Generalidades infecciones endodóncicas	6
Pulpa dental.....	9
Vías de invasión bacteriana.....	10
Clasificación clínica de patologías pulpares y periapicales	12
Necrosis pulpar	13
Patrones de necrosis pulpar.....	14
Diagnóstico clínico	14
Tratamiento	15
Perfiles microbiológicos en necrosis pulpar.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
General.....	19
Particulares	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	20
POBLACIÓN DE ESTUDIO	20
CRITERIOS DE SELECCIÓN	21
EVALUACIÓN CLÍNICA Y TOMA DE MUESTRAS	21
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	22
Procesamiento de muestras	22
Especies bacterianas y condiciones de cultivo.....	23

Purificación de DNA y preparación de sondas	23
Hibridaciones DNA-DNA.....	24
Detección y cuantificación de microorganismos.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	25
RESULTADOS.....	27
EVALUACIÓN CLÍNICA	27
Características de la población de estudio.....	27
<i>Características generales.....</i>	<i>27</i>
<i>Características endodóncicas.....</i>	<i>27</i>
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	28
Comparaciones microbiológicas entre grupos con Necrosis, Periodontitis Apical Asintomática y Periodontitis Apical Sintomática.....	28
<i>Niveles promedio</i>	<i>28</i>
<i>Prevalencia promedio.....</i>	<i>29</i>
<i>Proporciones promedio.....</i>	<i>31</i>
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
TABLAS.....	44
Tabla 1. Especies bacterianas representativos en infecciones endodóncicas.	44
Tabla 2. Clasificación clínica de patologías pulpares y periapicales basada en la propuesta de la AAE de diciembre de 2009.	45
Tabla 3. Cepas de referencia que se utilizarán para la elaboración de sondas de DNA.	46
Tabla 4. Criterios de selección.....	47
Tabla 5. Descripción de la población de estudio.	47
Tabla 6. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10 ⁵ ± EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).....	48

Tabla 7. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 44 especies bacteriana evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).....	49
Tabla 8. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).	50
Tabla 9. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).	51
Tabla 10. Niveles totales promedio y prevalencia total promedio (cuentas bacterianas totales $\times 10^5 \pm$ EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).	51
FIGURAS	52
ANEXOS	57

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que, gracias al apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, con el proyecto PAPIIT-IA203622-2022 de la Dirección General del Personal Académico y gracias al Sistema de Gestión de la Calidad ISO:9001:2015, del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (LIFO) se pudo desarrollar el presente proyecto.

A la Facultad de Odontología y al Posgrado de la Facultad de Odontología por las facilidades para la búsqueda y recolección de muestras para el desarrollo del presente proyecto en sus clínicas de endodoncia.

Un especial agradecimiento al Esp. Gustavo Francisco Argüello Regalado por su invaluable apoyo y mentoría durante la carrera, así como por abrirme las puertas para poder realizar este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie y a la Dra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández por todo su trabajo, apoyo, dedicación y compromiso para la realización de esta investigación. Ha sido un honor el poder trabajar con ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres Vero e Isaías, por todo su apoyo y amor, así como por siempre creer en mí.

A mi hermana Gaby, por ser un gran ejemplo de lo que es ser una mujer valiente.

A mi sobrino Carlitos, por toda la felicidad y amor que has traído a mi vida.

A mis amigas Karen, Zuri, Bianca y Paulina, por siempre estar presentes e inspirarme a ser mejor día con día.

A mi novio Daniel, por ser mi mejor aliado y siempre impulsarme a crecer.

RESUMEN

Introducción: Las patologías pulpares y de los tejidos periapicales presentan etiología microbiana, por lo que el éxito de su tratamiento dependerá de la comprensión de la microbiota asociada a cada lesión. Particularmente, la identificación de la microbiota en necrosis pulpar, se ha dificultado debido al proceso de muestreo y las técnicas microbiológicas empleadas, dando como resultado un reducido número de estudios que describan la identificación de un número extenso de especies bacterianas. **Objetivo general:** Describir los perfiles microbiológicos asociados a muestras de tejido pulpar necrótico proveniente de dientes sin hallazgos radiográficos de lesión periapical, mediante la utilización de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio de tipo transversal en el que se evaluó microbiológicamente 11 muestras de pulpa dental necrótica. Las muestras obtenidas se evaluaron para determinar los niveles (niv.), prevalencia (prev.) y proporción (prop.) de 40 especies bacterianas utilizando la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA. La base de datos obtenida se comparó con muestras de Periodontitis Apical Asintomática (PAA, n=21) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS, n= 17), por medio de pruebas no paramétricas U de Mann Whitney y Kruskal Wallis en el software SPSS. **Resultados:** Se describió como perfil microbiológico de necrosis pulpar a especies tales como: *S. intermedius* (niv_ $p < 0.01$), *C. ochracea* (niv_ $p < 0.001$; prev_ $p < 0.01$; prop_ $p < 0.001$), *A. odontolyticus* (niv_ $p < 0.001$; prev_ $p < 0.01$; prop_ $p < 0.05$), *C. showae* (niv_ $p < 0.001$; prev_ $p < 0.001$; prop_ $p < 0.001$;) y *P. nigrescens* (niv_ $p < 0.001$; prev_ $p < 0.001$; prop_ $p < 0.001$) con medias mayores en necrosis, en comparación con los grupos de PAA y PAS. Los complejos bacterianos con mayor proporción en necrosis, con diferencias significativas fueron el amarillo ($p < 0.05$. 40.5%), el naranja (NS, 24.2%) y especies del complejo verde ($p < 0.05$, 15%) en comparación con las muestras de los grupos PAA y PAS. **Conclusión:** Las muestras de necrosis pulpar sin lesión periapical presentaron un perfil microbiológico con predominio de especies colonizadoras tempranas y algunas especies patógenas putativas. La microbiota detectada indica la presencia de una biopelícula medianamente madura lo cual es la posible razón de que no muestren lesión periapical.

INTRODUCCIÓN

La endodoncia es una disciplina que se especializa en el diagnóstico y tratamiento de las patologías pulpares y periapicales. Gran parte del tratamiento a realizar será con el objetivo de eliminar la infección causada por los microorganismos que se alojan en el sistema de conductos de los dientes, así como para prevenir la reinfección de este sistema y tejidos periapicales.

La pulpa dental es el tejido blanco laxo especializado que ocupa la cámara y conducto radicular de los dientes. Este tejido alberga un gran número de elementos tisulares y su principal misión es la de elaborar dentina. En condiciones normales, la pulpa y la dentina son estériles y están aisladas de los microorganismos bucales por el esmalte y el cemento que las recubren. Hay circunstancias en las que se pierde la integridad de estas capas protectoras o en las que no existe de forma natural. En tales casos, el complejo dentinopulpar queda expuesto al medio bucal y corre el riesgo de infectarse por los microorganismos bucales. Algunas de las vías de infección de la pulpa son: exposición de los túbulos dentinarios, exposición pulpar directa, enfermedad periodontal y anacoressis. Una vez que las bacterias están en la pulpa, la inflamación puede ocurrir y puede dar lugar a la necrosis en el conducto radicular. La necrosis pulpar es la muerte de la pulpa, lo que significa el cese de los procesos metabólicos de ese órgano, con la consecuente pérdida de su estructura y de sus defensas naturales. El tejido necrótico se infecta muy fácilmente, ya que los mecanismos de defensa del hospedero no funcionan en tales tejidos y los mecanismos de defensa de los tejidos periapicales no alcanzan la cámara pulpar. Por lo tanto, este hecho implica que existe un excelente ambiente para el desarrollo de microorganismos.

En la cavidad oral se pueden encontrar más de 700 especies bacterianas, sin embargo, solo algunas de estas pueden encontrar las condiciones adecuadas para colonizar el sistema de conductos radiculares. Por años se ha estudiado la microbiota involucrada en las infecciones

endodóncicas, sin embargo, su identificación se dificultaba debido a que la mayoría de las técnicas empleadas tenían limitaciones para identificar a los microorganismos anaerobios. En las últimas décadas se han utilizado técnicas de biología molecular, las cuales han resultado ser un método más efectivo y eficiente para reconocer nuevos patógenos putativos. Diversos estudios han utilizado estas técnicas para analizar la microbiología de dientes con diagnóstico de necrosis pulpar y han logrado encontrar y demostrar que las infecciones endodóncicas tienen una naturaleza polimicrobiana y que la flora anaeróbica es la más frecuente.

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo es describir los perfiles microbiológicos asociados a muestras de tejido pulpar necrótico proveniente de dientes sin hallazgos radiográficos de lesión periapical, mediante la utilización de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.

MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES INFECCIONES ENDODÓNICAS

La endodoncia es una disciplina clínica que comprende la biología y patología de la pulpa y el periápice. La mayor parte de la terapia endodóncica está encaminada, directa o indirectamente, a la eliminación de los microorganismos existentes y a la prevención de la infección o reinfecciones de la pulpa y tejidos periapicales[1].

Antony Van Leeuwenhoek, el inventor del microscopio de una lente, fue el primero en observar la flora oral. Su descripción de los “animálculos” observados con su microscopio incluyó aquellos provenientes de la placa dentobacteriana y de una cavidad pulpar expuesta [2].

En 1894 Willoughby D. Miller, Padre de la microbiología oral, se convirtió en el primer investigador que asoció la presencia de bacterias con la periodontitis apical. Por medio de bacterioscopía de muestras de los conductos, encontró células bacterianas de las 3 morfologías básicas que se conocían en ese tiempo: cocos, bacilos y espirilos. Cultivó y caracterizó a las bacterias de la pulpa necrótica y estudió su potencial patogénico en experimentos animales [3].

Una pieza clave del importante papel de los microorganismos en la patogénesis de las lesiones apicales inflamatorias fue provista por el estudio clásico de Kakehashi & col. en 1965. Estos investigadores encontraron que no ocurrieron cambios patológicos en pulpas y tejidos periapicales expuestos en ratas libres de bacterias. Sin embargo, en animales convencionales la exposición de la pulpa permitió el desarrollo de necrosis pulpar y por consiguiente la formación de lesiones perirradiculares [4].

Hasta la década del 70, se aislaban especies microbianas del conducto radicular por medio de técnicas de cultivo estrictamente aerobias, por lo tanto se encontraban anaerobias estrictas en

apenas 25% de los casos [5], siendo la técnica de cultivo anaerobia exclusiva de pocos, en razón del alto costo para aislar esas bacterias.

Estudios de cultivos en humanos, cuando se consideró la naturaleza anaeróbica obligada de la microbiota del conducto radicular, fueron también capaces de mostrar una conexión de la periodontitis apical con la presencia de bacterias en los conductos radiculares. En estos estudios se accedió a pulpas con necrosis cerrada después de traumatismos y fueron muestreados para realizar cultivos de bacterias bajo estrictas condiciones asépticas. Efectivamente se confirmó una gran asociación en que la ausencia de crecimiento bacteriano se correlacionó con casos sin signos radiográficos de inflamación apical, mientras en la mayoría de casos, con lesiones obvias se produjo crecimiento bacteriano [6-9].

Por otro lado, en 1975 Wittgow y Sabiston [5] insisten en que encontraron infección por microorganismos en 32 de 40 dientes no vitales, con cámara pulpar intacta por traumatismos, y recuerdan el riesgo de provocar una exacerbación inflamatoria si, al sobre instrumentar, pasan los gérmenes al hueso alveolar. Este riesgo lo repiten en su trabajo Keudell y cols. [10], quienes encontraron un 64% de anaerobios obligados en las pulpas necróticas examinadas.

Diversos estudios han demostrado que un elevado número de dientes con pulpa necrótica, con lesión periapical o sin ella, quedaban con el tiempo estériles, aún después de haber estado infectados, tanto por la acción defensiva del sistema inmunológico del huésped como por sucumbir víctimas de sus propios metabolitos [11]. El porcentaje varía según los autores, y se puede citar que el número de cultivos negativos en dientes con pulpa necrótica es, según Burket 20%[12], Grossman 30%[13], Ostrander y Crowley 38%[14] y Pohto 54% [15].

Los dientes con pulpa necrótica por causas degenerativas o traumáticas, pero conservando la integridad de su corona, han sido estudiados por Engström y Frostell [16]. Estos autores suecos

realizaron interesantes hallazgos y demostraron que la flora anaeróbica es la más frecuente, insistiendo en la importancia de hacer el cultivo bacteriano en el momento de abrir la cámara pulpar y no durante el tratamiento el diente o después de él, para evitar contaminación.

En 1989, Sundqvist & col. cultivaron muestras de conductos radiculares intactos y encontraron que el 91% de los microorganismos eran anaerobios estrictos [17].

Lana et al [18], analizó 31 conductos radiculares con diagnóstico de necrosis pulpar, antes y después de su manipulación o preparación biomecánica. Los géneros aislados que presentaron mayor frecuencia fueron: *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Peptostreptococcus* para las bacterias, y *Candida* y *Saccharomyces* para las levaduras. El total de microorganismos anaerobios estrictos aislados fue de 54 especies. El 82% de los conductos evaluados mostraron infección polimicrobiana. Las bacterias anaerobias estrictas fueron recuperadas en el 80% de los casos; las bacterias anaerobias facultativas en el 51% y las especies microaerófilas en un 18.5% de los casos. Fueron determinadas además fuertes asociaciones positivas, particularmente entre *Clostridium* con *Prevotella* y *Peptostreptococcus* con *Fusobacterium*.

Jacinto et al [19], comparó hallazgos microbiológicos de dientes con necrosis pulpar asintomática (29 casos) con dientes con el mismo diagnóstico y que presentaban sintomatología clínica. Los conductos radiculares de dientes con sintomatología presentaron mayor porcentaje de anaerobios estrictos y mayor número de especies bacterianas por conducto en relación con los dientes asintomáticos. Los más comúnmente aislados fueron: *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus prevotti*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella*. El 39% del total de especies aisladas estuvo constituida por bacterias Gram negativas y fueron relacionadas con sintomatología. La inflamación estuvo estadísticamente relacionada con

Fusobacterium nucleatum, mientras que el dolor a la percusión fue relacionado a *Bifidobacterium* y *Actinomyces*.

PULPA DENTAL

La pulpa es un tejido blando de origen mesenquimatoso con células especializadas, los odontoblastos, dispuestos periféricamente en contacto directo con la matriz de la dentina. En general, se considera a la pulpa como un tejido blando laxo especializado [20].

La relación que se establece entre los odontoblastos y la dentina, denominada a veces como complejo pulpo dentinario [21-23], es una de las razones por las que la pulpa y la dentina se deben considerar una unidad funcional compuesta por elementos histológicamente diferentes.

La pulpa, que ocupa la cavidad central del diente –cámara pulpar y conducto radicular- se comunica con el ligamento periodontal a través del foramen apical o de foraminas apicales, inclusive por medio de eventuales conductos laterales, por los que pasan los elementos vasculares y nerviosos [20].

La pulpa dental alberga un gran número de elementos tisulares, incluido los nervios, el tejido vascular, fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, líquido intersticial, los odontoblastos, los fibroblastos y otros componentes celulares menores [20].

La principal misión de la pulpa es la de elaborar dentina, a la que aporta elementos nutritivos y sensibilidad [20].

Tras el desarrollo del diente, la pulpa conserva su capacidad para formar dentina a lo largo de toda la vida. Ello la capacita a compensar parcialmente la pérdida de esmalte y dentina causada por trauma mecánico o enfermedad [20].

VÍAS DE INVASIÓN BACTERIANA

En condiciones normales, la pulpa dental y la dentina son estériles y están aisladas de los microorganismos bucales por el esmalte y el cemento que las recubren. Hay circunstancias en las que se pierde la integridad de estas capas protectoras o en las que no existe de forma natural. En tales casos, el complejo dentino pulpar queda expuesto al medio bucal y corre el riesgo de infectarse por los microorganismos bucales [24].

En dientes aparentemente intactos los microorganismos también pueden encontrar la forma de acceder a los conductos radiculares donde se perdieron funciones vitales de la pulpa, la atracción es el tejido necrótico que sirve como nutriente principal para el crecimiento y multiplicación microbiano [25].

Una infección de la pulpa puede ocurrir por diversas vías:

- **Túbulos dentinarios:** Siempre que la dentina queda al descubierto, la pulpa está expuesta a las infecciones debido a la permeabilidad de la dentina normal, que depende directamente de su estructura tubular. La dentina expuesta puede ser invadida por los microorganismos presentes en las lesiones cariosas, en la saliva que recubre la zona expuesta o en la placa dentobacteriana que se forma sobre dicha zona. El diámetro tubular más pequeño es totalmente compatible con el diámetro celular de la mayoría de las bacterias bucales, que suele oscilar entre 0.2 y 0.7 μ m [26]. Por consiguiente, se podría asumir que una vez al descubierto, la dentina ofrece una vía de acceso sin obstáculos para que las bacterias puedan acceder a la pulpa a través de los túbulos. Sin embargo, no sucede así. Las bacterias invaden los túbulos dentinarios con más rapidez en los dientes desvitalizados que en los vitales [27]. En los dientes vitales, la salida de líquido dentinario y el contenido tubular alteran la permeabilidad dentinaria y presumiblemente podrían retrasar la invasión intratubular de las

bacterias. Por consiguiente, siempre que la pulpa mantenga su vitalidad, la exposición dentinaria no constituye una vía importante para la infección pulpar, salvo cuando el espesor de la dentina disminuye considerablemente y por consiguiente, aumenta significativamente su permeabilidad. Por otra parte, si la pulpa está necrosada, los túbulos dentinarios expuestos pueden convertirse en vías directas para que las bacterias alcancen y colonicen la pulpa [24].

- **Exposición pulpar directa:** Representa la vía más clara para las infecciones endodóncicas. La caries es la causa más frecuente de exposición pulpar pero los microorganismos pueden acceder igualmente a la pulpa por la exposición pulpar directa secundaria a tratamientos restauradores yatrogénicos o traumatismos. El tejido pulpar expuesto entra en contacto directo con los microorganismos bucales de las lesiones cariosas, la saliva o la placa acumulada en la superficie expuesta y de modo casi invariable, la pulpa expuesta se inflama, se necrosa y se infecta. El tiempo que transcurre entre la exposición pulpar y la infección de todo el conducto es impredecible, aunque este suele ser un proceso lento [28].
- **Enfermedades periodontales:** Se ha comprobado que sólo se produce necrosis pulpar como consecuencia de la enfermedad periodontal si la bolsa periodontal llega hasta el foramen apical, provocando daños irreversibles en los principales vasos sanguíneos que penetran por dicho conducto [29]. Una vez que se necrosa la pulpa, los microorganismos periodontales pueden llegar a los conductos radiculares por las ramificaciones, los túbulos dentinarios expuestos y conductos apicales, e iniciar un proceso infeccioso [24].
- **Anacoresis:** Es un proceso por el que los microorganismos son transportados en la sangre o la linfa hasta una zona de inflamación, en donde abandonan el vaso, pasan al tejido dañado y producen una infección. No existen pruebas concluyentes que demuestren que este proceso puede representar una vía para la infección de los conductos radiculares. Se ha demostrado

la imposibilidad de recuperar bacterias de los conductos radiculares sin obturar después de infectar experimentalmente la circulación sanguínea [30], a menos que se hubieran instrumentado excesivamente dichos conductos durante el periodo de bacteremia, con la consiguiente lesión de los vasos sanguíneos periodontales y la extravasación de sangre a los conductos [31]. Aunque se ha postulado que la anacoresis podría ser el mecanismo por el que se infectarían los dientes traumatizados con coronas aparentemente intactas [32], las pruebas disponibles parecen indicar que la principal vía para la infección pulpar en estos casos es la exposición dentinaria por la formación de fracturas en el esmalte [33].

Una vez que las bacterias están en la pulpa, la inflamación puede ocurrir y puede dar lugar a la necrosis en el conducto radicular. El tejido necrótico se infecta muy fácilmente, ya que los mecanismos de defensa del hospedero no funcionan en tales tejidos y los mecanismos de defensa de los tejidos periapicales no alcanzan la cámara pulpar. Por lo tanto, este hecho implica que existe un excelente ambiente para el desarrollo de microorganismos [34-36]. Al contrario que en los procesos infecciosos de la pulpa vital, el curso de la infección es incontrolable y varía considerablemente. La tasa de invasión bacteriana depende del tipo y número de las bacterias invasoras, las condiciones ambientales de la cámara pulpar, el acceso de nutrientes y especialmente del líquido tisular o del suero extravasado, que sirven como nutrientes para las bacterias [37].

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE PATOLOGÍAS PULPARES Y PERIAPICALES

A finales de 2009, la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) publica una nueva terminología para el diagnóstico clínico, teniendo en cuenta que ha sido un tópico de discusión, controversia y debate por décadas, ya que los textos de Endodoncia han utilizado tradicionalmente términos muy amplios para describir los hallazgos histopatológicos, que no son aplicables a los

diagnósticos clínicos. Dicha clasificación divide las patologías en pulpares y periapicales y se muestran en la **Tabla 2** [38].

NECROSIS PULPAR

La necrosis pulpar es la muerte de la pulpa, lo que significa el cese de los procesos metabólicos de ese órgano, con la consecuente pérdida de su estructura y de sus defensas naturales. Puede ser parcial o total[39, 40].

La pulpa necrótica puede permanecer aséptica durante periodos variables. El tejido necrótico pulpar no parece afectar por sí mismo a los tejidos periapicales, mientras esté estéril, pero tampoco ofrece protección [37]. El tejido necrótico se infecta muy fácilmente, ya que los mecanismos de defensa del hospedero no funcionan en tales tejidos y los mecanismos de los tejidos periapicales no alcanzan la cámara pulpar. Por tanto, este hecho implica que exista un excelente ambiente para el desarrollo de los microorganismos. [39, 40]

La causa principal de la necrosis es la invasión microbiana producida por caries profunda, pulpitis o traumatismos con implicación pulpar. Otras causas poco frecuentes pueden ser procesos degenerativos, atróficos y periodontales avanzados[39, 40].

La aparición morfológica de la necrosis es consecuencia de la desnaturalización de las proteínas intracelulares y la digestión enzimática de la célula con daños mortales. Las células necróticas son incapaces de mantener la integridad de la membrana y sus contenidos se extravasan, un proceso capaz de estimular la inflamación en el tejido circundante. Las enzimas responsables de la digestión de la célula derivan de los lisosomas y pueden provenir de la misma célula que está muriendo o de los leucocitos reclutados como parte de la reacción inflamatoria[41]

Patrones de necrosis pulpar

En 1965 Grossman clasifica la necrosis pulpar en dos tipos[42]:

1. Necrosis por coagulación: Este proceso es característico de la muerte hipóxica de las células. Es una forma de necrosis en la que se conserva la estructura del tejido durante al menos unos días tras la muerte de las células que lo constituyen. Los tejidos afectados tienen una textura firme. Parece que la lesión no solo desnaturaliza las proteínas estructurales, sino también las enzimas, lo que bloquea la proteólisis de las células muertas; en consecuencia, las células eosinófilas anucleadas persisten durante días o semanas. Los leucocitos se atraen hacia el foco de necrosis y al final las células muertas se acaban digiriendo por la acción de las enzimas lisosómicas de los leucocitos. Posteriormente, los restos celulares se eliminan mediante fagocitosis mediada principalmente por los neutrófilos y macrófagos infiltrantes[41].
2. Necrosis por licuefacción: Este patrón de necrosis suele originarse en infecciones bacterianas focales y, en ocasiones, en las micóticas porque los microorganismos causan una rápida acumulación de células inflamatorias y las enzimas de los leucocitos digieren (“licúan”) el tejido. Independientemente de la patogenia, las células muertas se digieren por completo y el tejido se transforma en un líquido viscoso, que al final es eliminado por los fagocitos. Si el proceso se inicia por una inflamación aguda, como sucede en las infecciones bacterianas, el material adoptará con frecuencia un aspecto cremoso amarillento y se llamará pus[41].

Diagnóstico clínico

La necrosis pulpar es en general asintomática, siendo la alteración del color de la corona dental un indicador de la pérdida de vitalidad pulpar. No se obtiene respuesta con el frío y la

corriente eléctrica, pero el calor puede producir dolor al dilatarse el contenido gaseoso del conducto[38-40].

Tratamiento

El tratamiento de conducto radicular indicado para esos casos es la necro pulpectomía I que es el tratamiento de los conductos radiculares de dientes con necrosis pulpar sin reacción periapical crónica evidenciable radiográficamente. Esta técnica consiste en instrumentación complementada con irrigación y aspiración con soluciones bactericidas suaves que no irriten los tejidos apicales y periapicales. Así, el hipoclorito de sodio al 1% (solución de Milton) es la solución biológicamente recomendada para esos casos [43], debido a que no hubo tiempo de que ocurriese propagación bacteriana intensa en el sistema de conductos radiculares que fuese capaz de alcanzar la profundidad de las ramificaciones y de los túbulos dentinarios [9, 10, 44, 45].

PERFILES MICROBIOLÓGICOS EN NECROSIS PULPAR.

Más de 700 especies bacterianas pueden ser encontradas en la cavidad oral [46]. Sin embargo, sólo una variedad limitada de éstas puede encontrar condiciones apropiadas para colonizar el sistema de conductos radiculares [47] (**Tabla 1**). Tradicionalmente, los microorganismos involucrados en las infecciones endodóncicas han sido estudiados por medio de técnicas cultivo [18, 48, 49], las cuales han demostrado tener bastantes limitaciones en lo que se refiere al diagnóstico microbiológico [50, 51]. La tecnología molecular ha permitido el reconocimiento de nuevos patógenos putativos que nunca habían sido encontrados antes en infecciones endodóncicas [52-54]

Las infecciones endodóncicas tienen una naturaleza polimicrobiana[36, 55-60] con más de 100 géneros bacterianos identificados[61]. Agregado a esto, los perfiles bacterianos de la microbiota endodóncica presentan una variación individual, lo cual indica que la diversidad de especies y abundancia de estas pueden variar de individuo a individuo [52, 62-64].

Las infecciones primarias son causadas por microorganismos que inicialmente invadieron y colonizaron el tejido pulpar necrótico [20, 24, 58-60, 65]. Estos microorganismos pudieron haber estado involucrados en etapas tempranas de la invasión pulpar (caries), que culminaron en inflamación y necrosis [20, 59, 60].

Algunos reportes indican que las bacterias anaerobias obligadas dominan la microbiota en las infecciones primarias [17, 66]. Estas constituyen 91% de los aislamientos de necrosis cerradas [9], 90% de los aislamientos de pulpas necróticas en dientes deciduos y 68% de la parte apical de las pulpas necróticas en dientes cariados [9].

Las especies bacterianas conocidas más prevalentes en infecciones primarias pertenecen a diversos géneros bacterianos Gram negativos (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veillonella*) y Gram positivos (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*) [9, 18, 48, 52, 55, 65, 67-81]

Recientes estudios han demostrado que alrededor del 40% al 55% de la microbiota endodóncica en infecciones primarias está compuesta por especies aun no cultivadas [52, 74]. Filotipos aún no cultivados pertenecientes a los géneros *Synergistes*, *Dialister*, *Prevotella*, *Solobacterium*, *Olsenella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Veillonella* and *Selenomonas*, así como filotipos relacionados con la familia *Lachnospiraceae* o *Saccharibacteria* (conocido también como TM7), han sido frecuentemente detectados en muestras de infecciones endodóncicas primarias [52, 62, 74, 76, 82-85].

Otros microorganismos diferentes a las bacterias han sido ocasionalmente encontrados en infecciones endodóncicas. Los hongos son microorganismos eucariontes que han sido esporádicamente encontrados en infecciones primarias [18, 86]. Las arqueas comprenden un grupo

muy diverso de procariontes, distintos de las bacterias, sin patógenos humanos conocidos. Un estudio encontró arqueas metanogénicas en los conductos de dientes con periodontitis apical crónica [87]. Los virus son partículas que no tiene metabolismo propio y requieren células receptoras viables para infectar y así poder replicarse, por lo que no pueden sobrevivir en el conducto radicular con pulpa necrótica [24].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los objetivos principales del tratamiento de conductos son los de eliminar el proceso inflamatorio e infeccioso de la periodontitis apical. Dado que la principal causa de esta condición es la infección de los conductos radiculares, es de suma importancia conocer los aspectos microbiológicos que se presentan previo, durante y después de su manifestación, para así poder tener un mejor manejo tanto en el tratamiento clínico como en las terapias antimicrobianas que se prescriban.

La necrosis pulpar es una de las patologías pulpares que preceden a la aparición de la periodontitis apical. Diversos estudios se han enfocado en analizar e identificar la microbiota de esta patología, sin embargo, pocos de ellos han analizado muestras de necrosis pulpar con tejido apical normal basándose en la nueva clasificación de la Asociación Americana de Endodoncistas.

En los últimos años, los métodos de identificación moleculares han sido fundamentales para el estudio e identificación de las especies no cultivables relacionadas a patologías endodóncicas, por lo que se requiere continuar profundizando y ampliando la información existente para tener un mejor entendimiento de la etiología de la necrosis pulpar.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la microbiología endodóncica se ha complicado por dificultades en el proceso del muestreo y las técnicas microbiológicas empleadas para identificar a las especies no cultivables involucradas en los procesos patológicos. Por lo tanto, existen pocos estudios que describan la identificación de un número extenso de especies bacterianas con la nueva clasificación. Debido a esto, el presente estudio se enfocará en determinar la prevalencia, proporción y niveles de 40 especies bacterianas diferentes en muestras de tejido pulpar necrótico proveniente de dientes sin hallazgos radiográficos de lesión periapical, utilizando sondas de DNA. Dicha técnica es de uso

molecular y permitirá presentar las especies por complejos bacterianos de colonización primaria, puente y tardía para poder definir su asociación con las especies que colonizan la placa dentobacteriana subgingival.

HIPÓTESIS

Pregunta: ¿Se encontrarán distintos perfiles microbiológicos en las muestras recolectadas de necrosis pulpar contra bases de datos de muestras microbiológicas de Periodontitis Apical Asintomática y Periodontitis Apical Sintomática?

Se encontrarán perfiles microbiológicos similares en las muestras microbiológicas de necrosis pulpar contra bases de datos de muestras de Periodontitis Apical Asintomática y Periodontitis Apical Sintomática.

OBJETIVOS

General

Describir los perfiles microbiológicos asociados a muestras de tejido pulpar necrótico proveniente de dientes sin hallazgos radiográficos de lesión periapical, mediante la utilización de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA, y compararla con bases de datos de muestras microbiológicas de Periodontitis Apical Asintomática y Periodontitis Apical Sintomática.

Particulares

1. Recolectar 11 muestras de tejido necrótico de dientes que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión de acuerdo con la clasificación de AAE de 2009 para necrosis pulpar.

2. Identificar muestras de dientes de necrosis para determinar los niveles, prevalencia y proporción de 40 especies bacterianas por medio de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.
3. Describir los perfiles microbiológicos de muestras de necrosis pulpar (n=11) agrupadas por sujetos de estudio y compararlos con muestras microbiológicas con periodontitis apical asintomática (n=21) y periodontitis apical sintomática (n=17), provenientes de una base de datos del Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología UNAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio de tipo transversal en el que se evaluó microbiológicamente muestras de pulpa dental necrótica para determinar los niveles, prevalencia y proporción de 40 especies bacterianas utilizando la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA [88]. Los sujetos de estudio fueron evaluados en una sola visita, en la cual se realizó una evaluación de su estado de salud general y pulpar, se registraron los datos clínicos generales, se recolectaron datos clínicos y muestras.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio consistió en un total de 11 muestras que presentaron pulpa dental necrótica sin lesión periapical evidente radiográficamente. Las muestras evaluadas fueron seleccionadas de los individuos que acuden a consulta a la Clínica de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, así como de las clínicas de Endodoncia de la Facultad de Odontología. El propósito y naturaleza del estudio;

incluyendo los procedimientos clínicos y para la recolección de muestras, fueron explicados a cada sujeto potencial de estudio. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado (**Anexo 1**) en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio. Se pidió a los sujetos que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron mexicanos por nacimiento, mayores de 25 años, en buen estado de salud general y presentaron por lo menos 15 dientes naturales en boca. Los criterios de exclusión comprendieron a mujeres que estuvieran embarazadas o en periodo de lactancia, así como individuos que hubieran tomado cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los tres meses previos a su evaluación para el estudio. Fueron excluidos de estudio también, aquellos que presentaron condiciones sistémicas que pudieran influir sobre el curso o severidad de la enfermedad pulpar, tales como VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes, etc., así como los casos en los que se presenten fistulas, lesiones periodontales con una pérdida de inserción mayor a 3mm, lesión periapical radiográficamente visible o con cualquier evidencia de comunicación directa entre la cavidad oral y la región periapical en el diente que fue evaluado.

EVALUACIÓN CLÍNICA Y TOMA DE MUESTRAS

Cada sujeto de estudio recibió una evaluación pulpar completa realizada por un solo clínico capacitado para este propósito. A todos los sujetos se les realizó profilaxis con copa de hule y pasta profiláctica, del diente a evaluar y los dos contiguos de cada lado. Al terminar esto se les pidió que realizaran un enjuague bucal por 30 segundos con 15 ml de solución de clorhexidina y gluconato al 12% (Peridex®; Zila Pharmaceuticals, Phoenix, AZ, USA) y después se les administró el anestésico local pertinente en los casos que lo requirieron.

En total, 11 muestras de tejido pulpar necrótico fueron recolectadas (1 de cada sujeto de estudio), de los conductos radiculares de los dientes que reunieron los criterios de selección. Para recolectar las muestras de tejido necrótico, el diente fue aislado con dique de hule y se realizaron un acceso coronal con fresas redondas esterilizadas (calibre según diente para trabajar). Se insertó una lima estéril Nº 20 en el conducto radicular a la longitud aparente. Se introdujeron 2 puntas de papel estériles calibre 20, las cuales fueron insertadas en el conducto radicular a 1 mm de la longitud real y permanecieron ahí durante 20 seg. Una sección de 2 cm del extremo apical la punta de papel fue utilizada para el análisis microbiológico.

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Procesamiento de muestras

Todas las muestras fueron colocadas en tubos individuales que contuvieron 150 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6 Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Las bacterias en las muestras fueron dispersadas con vórtex y se agregó 100 µl de 0.5 M NaOH (Sigma) a cada tubo. Los tubos fueron hervidos durante 10min. y el pH neutralizado con 800 µl de acetato de amonio (5M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un Minislot-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron en mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas. Las evaluaciones microbiológicas fueron llevadas a cabo en cada muestra individualmente. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se encuentra en la **Tabla 3**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido (17g- *Mycoplasma* agar base, 5ml- solución stock de Hemina, 500ml- agua destilada UV/UF, 5ml- vitamina K, 25ml- sangre de carnero desfibrinada) a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N², 10% CO² y 10% H² (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente en agar base sin suplementos). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5ml de formato (60mg/ml)- fumarato (60mg/ml); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1mg/ml), niacinamida (400µg/ml), tetrahidrocloreuro de esparmina (150µg/ml), isobutirato de sodio (20µg/ml), L-cisteina (1mg/ml), pirofosfato de tiamina (5µg/ml) y suero bovino (0.5%).

Purificación de DNA y preparación de sondas

El crecimiento después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5ml que contuvieron 1ml de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación a 3,500rpm en buffer TE durante 10min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15seg. y lisadas a 37°C durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20mg/ml, Sigma) para las especies Gram negativas, o con una mezcla enzimática con 15mg/ml de lisozima (Sigma) y 5mg/ml de achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita [89]. La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada

mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260nm y 280nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 40 especies bacterianas de prueba (**Tabla 3**) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita [90].

Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contuvo 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1xSSC = 150mM NaCl, 15mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado de las cepas aisladas fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5xSSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas durante 8 horas e a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detecten un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20min, cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1xSSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

Detección y cuantificación de microorganismos

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador con 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maléico, 150mM NaCl, pH 7.5).

Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita [91]. Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35min. Las películas fueron reveladas siguiendo el procedimiento estándar y posteriormente fueron fotografiadas con cámara Digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (DigiDoc. BioRad) se enviaron a un programa (Quantity One. BioRad), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los checkerboards.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

El empleo de la técnica de “Checkerboard” permitió la identificación de 40 especies bacterianas (**Tabla 3**) en cada una de las muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto de estudio en un mismo experimento. Así mismo, fue posible cuantificar los niveles, prevalencia y proporción de cada una de las 40 especies. De esta forma, los datos microbiológicos que se obtuvieron de cada sujeto de estudio incluyeron 3 matrices de datos (niveles, prevalencia y proporción).

La composición microbiológica de las muestras de pulpas necróticas de cada sujeto de estudio (**Tabla 5**) fue determinada calculando las cuentas absolutas de cada una de las 40 especies bacterianas evaluadas en cada muestra de manera individual. Los datos microbiológicos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) de los niveles (cuentas bacterianas $\times 10^5$), proporción (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) y prevalencia (porcentaje

de sitios colonizados), cada uno calculado para cada especie bacteriana en cada muestra y promediado entre los sujetos de población de estudio.

Para la comparación de los datos microbiológicos obtenidos, se tomó una base de datos de 21 dientes con Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y 17 dientes con Periodontitis Apical Sintomática (PAS), para así poder realizar la comparación de los resultados con dos grupos control: N (n=11), PAA (n=21) y PAS (n=17)[92] por medio de pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y U de Mann Whitney con el software SPSS.

RESULTADOS

EVALUACIÓN CLÍNICA

Características de la población de estudio

Las características generales y endodóncicas de las muestras evaluadas se incluyen en la **Tabla**

4. Cada uno de los datos en las distintas poblaciones se expresaron como la media \pm el EEM. Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados (Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney).

Características generales

La población completa constó de 11 muestras microbiológicas de Necrosis (N, $n=11$). Para la comparación de los datos microbiológicos obtenidos, adicionalmente, se tomó una base de datos del Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM, la cual constó de 21 muestras microbiológicas con Periodontitis Apical Asintomática (PAA, $n=21$) y 17 muestras microbiológicas con Periodontitis Apical Sintomática (PAS, $n=17$), para así poder realizar la comparación de los resultados entre grupos (**Tabla 5**).

Cada uno de los datos en las distintas poblaciones, se expresaron como media \pm EEM. Se describe el número de muestras de estudio, la edad (años), el género (% mujeres) y número de dientes muestreados (%posteriores). Se pudo observar que las diferencias entre las poblaciones de N vs. PAA y PAS no fueron significativas para las pruebas de Kruskal-Wallis y en las pruebas pareadas de U de Mann Whitney.

Características endodóncicas

Las características endodóncicas de las muestras evaluadas fueron 11 muestras de tejido pulpar tomadas de dientes sin comunicación entre la cavidad oral y el tejido periapical, las cuales

no presentaron lesiones periodontales y tampoco mostraron engrosamiento del ligamento periodontal o zonas radiolúcidas en la evaluación radiográfica (**Tabla 4**).

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Comparaciones microbiológicas entre grupos con Necrosis, Periodontitis Apical Asintomática y Periodontitis Apical Sintomática.

Niveles promedio

Las diferencias estadísticamente significativas de los niveles totales promedio se muestran en la **Tabla 10**. Cuando se compararon las cuentas bacterianas totales entre muestras con N vs. PAA y PAS con la prueba de Kruskal Wallis, las diferencias entre los tres grupos reportan significancia con mayores cuentas en N ($p < 0.01$). En las comparaciones entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney (**Figura 1**), al comparar N vs. PAA se encontraron mayores cuentas en N ($p < 0.05$) y al comparar N vs. PAS se encontraron mayores cuentas en N ($p < 0.001$).

Las diferencias estadísticamente significativas de los niveles individuales promedio se muestran en la **Tabla 6**. Cuando se compararon las cuentas bacterianas de especies individuales entre muestras con N vs. PAA y PAS con la prueba de Kruskal Wallis, las diferencias entre los tres grupos reportan significancia en *A. naeslundii*, *C. gingivalis* y *S. sanguinis* con mayores cuentas promedio en muestras de PAA ($p < 0.05$) y *P. gingivalis* con mayores cuentas en PAS ($p < 0.05$), para *E. sulci*, *L. buccalis* y *S. constellatus* con mayores cuentas en PAA ($p < 0.01$); *S. intermedius* con mayores cuentas en N ($p < 0.01$); para *A. odontolyticus*, *C. showae*, *C. ochracea* y *P. nigrescens* con mayores cuentas en N ($p < 0.01$); para *A. odontolyticus*, *C. showae*, *C. ochracea* y *P. nigrescens* con mayores cuentas en N ($p < 0.001$) y *F. periodonticum* con mayores cuentas en PAA ($p < 0.001$).

Particularmente, en las comparaciones entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney (**Tabla 6 y Figura 2**), al comparar N vs PAA se encontró diferencias significativas en *E. corrodens*, *L. buccalis*, *S. gordonii* y *S. sanguinis* con mayores cuentas en PAA ($p<0.05$), en *A. odontolyticus* y *C. ochracea* con mayores cuentas en N ($p<0.01$) y en *A. naeslundii*, *C. gingivalis* y *F. periodonticum* con mayores cuentas en PAA ($p<0.01$) y en *C. showae* y *P. nigrescens* con mayores cuentas en N ($p<0.001$). Cuando se compararon N vs PAS, se observaron diferencias significativas en *S. intermedius* y *C. ochracea* ($p<0.05$) con mayores cuentas en muestras de N y en *P. gingivalis* y *C. rectus* con mayores cuentas en PAS ($p<0.05$), y en *A. odontolyticus*, *C. showae* y *P. nigrescens* con mayores cuentas en N ($p<0.001$). A diferencia de las comparaciones contra necrosis, al analizar las diferencias entre PAA vs PAS, se observó que únicamente 3 especies bacterianas presentaron significancias, siendo estas en *F. periodonticum*, *L. buccalis* ($p<0.05$) y en *E. sulci* ($p<0.01$), todas con mayores cuentas en muestras de PAA.

Prevalencia promedio

En prevalencia promedio de especies individuales, los tres grupos evaluados mostraron diferencias en la prevalencia de distintas especies (**Tabla 7 y Figura 3**).

En necrosis la especie patógena putativa *P. nigrescens* y colonizadores tempranos como *C. showae* y *A. odontolyticus* mostraron el 100 % de prevalencia en necrosis en comparación con PAA y PAS. Por el contrario, se observó la ausencia (prevalencia 0 %) de las especies *A. naeslundii*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *E. corrodens*, *C. gingivalis*, *P. micra*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *C. gracilis*, *S. constellatus*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *S. noxia*, *F. alocis*, *P. acnés*, *P. melaninogenica* y *L. buccalis* en Necrosis pulpar en comparación con el resto de los grupos evaluados (**Tabla 7 y Figura 3**).

En el caso de PAA la mayor prevalencia (78.6%) la representaron las especies *C. matruchotii* (agrupada en "Otros") y *C. gingivalis* (del complejo verde). La especie que representó la menor prevalencia en PAA (0%) fue *C. gracilis* especie del complejo naranja. En las muestras de PAS, la especie *P. gingivalis*, del complejo rojo, presentó la mayor prevalencia del resto de las especies (69.6%) y *S. constellatus*, del complejo naranja, representó la menor prevalencia 4.9%.

Las diferencias estadísticamente significativas de las prevalencias promedio mostradas en la **Tabla 7**, presentan la prevalencia de especies individuales entre muestras con N vs. PAA y PAS con la prueba de Kruskal Wallis, las diferencias entre los tres grupos reportan significancia en *A. naeslundii*, *C. matruchotii* y *S. sanguinis* ($p < 0.05$), las cuales mostraron mayor prevalencia en muestras de PAA, y *P. gingivalis* ($p < 0.05$) cuya prevalencia fue mayor en muestras de PAS. Se encontró significancia en *A. odontolyticus* y *C. ochracea* ($p < 0.01$), cuya prevalencia fue mayor en muestras de N mientras que las especies patógenas putativas *C. gingivalis*, *S. constellatus* y *L. buccalis* ($p < 0.01$), mostraron mayor prevalencia en PAA. Asimismo, se presentaron las especies *C. showae* ($p < 0.001$) y la especie patógena putativa *P. nigrescens* ($p < 0.001$) con mayor prevalencia en sujetos N, y la especie patógena putativa *F. periodonticum* ($p < 0.001$), con mayor prevalencia para las muestras de PAA.

Para las comparaciones entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney (**Tabla 7**), al comparar N vs. PAA se encontró significancia en *S. sanguinis*, *S. constellatus*, *E. corrodens* y *S. gordonii* ($p < 0.05$) con mayor prevalencia en PAA, en *C. showae* y *C. ochracea* con mayor prevalencia en N ($p < 0.01$) y en *A. naeslundii*, *C. gingivalis*, *L. buccalis* y *F. periodonticum* ($p < 0.01$) con mayor prevalencia en PAA. La especie patógena putativa *P. nigrescens* ($p < 0.001$), mostró mayor prevalencia en N vs. PAA y PAS. Cuando se compararon N vs. PAS, se encontró significancia para *P. nigrescens* y *S. intermedius* ($p < 0.05$) con mayores cuentas en muestras de N y *C. rectus* ($p < 0.05$) con mayor prevalencia en PAS, en *A. odontolyticus* ($p < 0.01$) con mayor prevalencia en N y para la especie

patógena reconocida *P. gingivalis* ($p < 0.01$) con mayor prevalencia en PAS. Así mismo se encontró significancia en *C. showae* ($p < 0.001$) con mayor prevalencia en N. A diferencia de las comparaciones entre los grupos de N vs. PAA y PAS, al analizar las diferencias entre PAA vs. PAS se observó que únicamente 4 especies bacterianas tenían significancia, siendo estas *F. periodonticum*, *L. buccalis*, *S. constellatus* y *C. matruchotii* ($p < 0.05$) todas con mayor prevalencia en muestras de PAA.

Proporciones promedio

Las diferencias estadísticamente significativas de las proporciones promedio, se observan en la **Tabla 7 y Figura 4**. La especie *S. oralis*, del complejo amarillo, representó mayores proporciones promedio en todos los sujetos con necrosis (30%), a diferencia de *C. sputigena*, *P. asaccharolytica*, *F. alocis*, *P. melaninogenica*, *A. naeslundii*, *L. buccalis*, *P. micra*, *S. constellatus*, *S. sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *F. periodonticum*, *C. gingivalis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *S. gordonii*, *P. acnes*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *S. noxia* y *C. gracilis* que presentan proporción promedio de 0 % en el grupo de Necrosis.

En el caso de PAA, la especie que mostró mayor proporción promedio (14.4%) en la población fue *A. naeslundii*. Por otra parte, las especies que representaron menor proporción fueron *N. mucosa*, *C. gracilis*, *S. oralis* y *S. constellatus* (0.1%). En las muestras de PAS, la especie que representó mayor proporción (13.2%) fue *S. intermedius*, del complejo amarillo y las especies *C. sputigena*, *N. mucosa*, *S. noxia* y *C. gracilis* mostraron las menores proporciones promedio (0%) (**Figura 4**).

Las proporciones promedio de especies individuales entre sujetos N, PAA y PAS, mostraron diferencias estadísticamente significativas con mayores proporciones en Necrosis para *A. odontolyticus* ($p < 0.05$), *P. nigrescens*, *C. showae* y *C. ochracea* ($p < 0.001$), en PAA para *A. naeslundii*,

C. rectus ($p<0.05$) y *P. gingivalis* ($p<0.01$), y en PAS para *S. sanguinis*, *C. gingivalis*, *C. matruchotii* ($p<0.05$), *L. buccalis*, *S. constellatus*, *E. sulci* ($p<0.01$) y *F. periodonticum* ($p<0.001$) (**Tabla 8**).

Las proporciones promedio de complejos bacterianos son mostradas en la **Figura 5**. En las muestras con necrosis encontramos mayor proporción en el complejo amarillo (40.5%) y menor en las especies no agrupadas (0.2%). En PAS y PAA, las especies agrupadas en otras muestran una mayor proporción (26% y 29.2% respectivamente) y las especies no agrupadas representan la menor proporción (2.6% y 0.1%).

Las comparaciones entre grupos con prueba de Kruskal Wallis entre N, PAA y PAS mostraron proporciones significativamente mayores en los complejos amarillo ($p<0.05$), verde ($p<0.05$), rojo ($p<0.001$) y otros ($p<0.001$). Las comparaciones entre sujetos N vs. PAA fueron estadísticamente significativas en el complejo verde ($p<0.05$) presentando mayor proporción en Necrosis y en Otros ($p<0.001$) con mayor proporción en PAA. Al comparar N vs. PAS, se encontraron diferencias significativas en el complejo amarillo ($p<0.05$) con mayor proporción en Necrosis y con mayor proporción en PAA en el complejo rojo y otros ($p<0.001$). Cuando se compararon PAA vs. PAS, se encontró significancia en el complejo amarillo ($p<0.05$) con mayor proporción en PAA y en el complejo rojo ($p<0.001$) con mayor proporción en PAS (**Tabla 9**).

DISCUSIÓN

El principal propósito del presente estudio fue el de describir el perfil microbiológico asociados a muestras de tejido pulpar necrótico proveniente de dientes sin hallazgos radiográficos de lesión periapical, además de describir las diferencias microbiológicas encontradas al compararlas con muestras de PAA y PAS provenientes de una base de datos del Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM.

En las evaluaciones realizadas para las características generales y clínicas endodóncicas de las muestras de estudio, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros clínicos establecidos, lo cual habla de una alta homogeneidad entre las muestras de los grupos a comparar. En cuanto a las características de los dientes evaluados, era importante determinar que ninguno de ellos presentara restauraciones, caries ni fracturas ya que estudios de Cayo-Rojas y cols., Baume y cols., y Fouad y cols. confirman que estas son vías de infección pulpar [93-95].

En las evaluaciones y comparaciones microbiológicas realizadas en el presente estudio, se observaron diversas diferencias significativas. Al analizar los niveles promedio de las muestras de N, PAA y PAS se encontró un mayor número cuentas bacterianas en las muestras de N. Esto pudiera ser debido a la mayor facilidad en el acceso para la toma de muestras con puntas de papel, ya que para las muestras de PAA y PAS el acceso fue quirúrgico. Autores como Hartroth y cols y Nickles y cols. aseguran que la toma de muestras con puntas de papel es más eficiente y permite obtener mejores muestras que con otros métodos[96, 97]. Por otro lado, a pesar de la alta carga bacteriana detectada en los dientes con necrosis, la microbiota identificada fue mayormente de especies colonizadoras tempranas, en menor proporción colonizadoras puente o patógenas putativas y diversas especies colonizadoras tardías presentaron prevalencia de cero en comparación con las muestras de los grupos de PAA y PAS. Hallazgos similares han sido reportados por Wittgow y cols.,

Lanay cols., Moller y cols., Sundqvist y cols., Siqueira y cols., y Baumgartner y cols.[5, 9, 18, 34, 36, 54, 55, 61, 62, 66]

Al analizar las comparaciones microbiológicas de niveles, prevalencia y proporción de nuestras muestras individuales en el grupo de necrosis, pudimos observar que el perfil microbiológico corresponde a especies colonizadoras tempranas en las que predominan *Streptococcus* sp., especies del complejo verde y *A. odontolyticus* del complejo morado, así como patógenas putativas muy selectivas del complejo naranja, representadas en mayor proporción por *C. showae*, *P. nigrescens* y *E. nodatum*. Por otro lado, la baja prevalencia de *F. nucleatum* podría ser una de las razones por las cuales en estas muestras no hay presencia de colonizadores tardíos como lo sugieren Ali y Socransky y cols., ya que esta especie actúa como un puente microbiano entre los colonizadores tempranos y los colonizadores tardíos[98-101]. Por otra parte, podemos observar la presencia de especies colonizadoras tempranas y asociadas a caries. Esto pudiera deberse a la presencia de microfracturas en el esmalte como lo han reportado estudios de Dumbryte, Hiatt, Ritchey y cols., y Chai y cols.[102-105]. De acuerdo con Berutti y Grossman y cols. otra razón podría ser la exposición de dentina en la unión amelo cementaria [106, 107]. Ricucci y cols. observaron que lesiones de caries incipientes, imperceptibles a la vista clínica y radiográfica, podrían ser otra de las causas de la presencia de estas especies bacterianas[108].

Asimismo, se pudo observar que las muestras microbiológicas de dientes con necrosis posiblemente correspondan a una biopelícula en fases intermedias de maduración ya que no existe presencia de colonizadores tardíos. A su vez, esto podría ser sustentado con la ausencia de sintomatología y lesiones periapicales radiográficas en los dientes de los que se tomaron las muestras de necrosis, ya que estudios de Buonavoglia y cols., Singh y cols., Sanghavi y cols., y Tiwari y cols. han relacionado la presencia de dolor y lesiones periapicales radiográficas en infecciones

endodóncicas y periodontales con la presencia de especies del complejo rojo[109-112], mismas que se vieron ausentes en la prevalencia de las muestras con necrosis del presente estudio.

Por último, como lo referencian autores como Socransky y cols. y Siqueira y cols., la relevancia de evaluar las muestras con la técnica de “Checkerboard” radica en que esta técnica nos muestra datos semi cuantitativos sobre la cantidad de bacterias presentes[88, 113], ya que uno de los factores que determina el desarrollo de una lesión endodóncica aguda o crónica es la cantidad de bacterias presentes, además de los factores de patogenicidad de cada especie identificada[36]. Con los resultados del presente estudio se propone la realización de futuros estudios utilizando pruebas con mayor sensibilidad como PCR o secuenciación, ya que con estos se podrían identificar patógenos del complejo rojo en los sitios de necrosis, que mientras que se pudieran encontrar presentes en la microbiota con necrosis pulpar junto con una mayor gama de bacterias no cultivables intra conducto como lo han publicado Sanghavi y cols., Tiwari y cols. y Rôças y cols., posiblemente no están jugando un papel de patogenicidad aguda de la microbiota de dientes con necrosis sin sintomatología y lesiones periapicales, por la carga bacteriana predominante de especies colonizadoras tempranas[111, 112, 114].

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 11 muestras de tejido pulpar y dado que se cumplieron todos los criterios de inclusión y se concluye que la microbiota corresponde con necrosis pulpar sin lesión periapical, dónde se describió un perfil microbiológico asociado a necrosis pulpar sin lesión periapical con predominio de especies colonizadoras primarias como son los *Streptococcus*, del complejo verde, del complejo morado como es *A. odontolyticus* y algunas especies patógenas putativas del complejo naranja, a diferencia de periodontitis apical asintomática y sintomática en la que predominan

especies de *Actinomyces* del complejo naranja, especies patógenas del complejo rojo y especies agrupadas en “otros”.

Se pudo identificar que el perfil microbiológico de las muestras de necrosis mostró características de una biopelícula medianamente madura, ya que presenta una predominancia de colonizadores tempranos y putativos y no se encontraron presentes patógenos reconocidos. Esto se puede deber a que los dientes de los que se tomaron las muestras no presentaron lesión periapical, caries, restauraciones ni fracturas, por lo que el hallazgo de las especies mencionadas anteriormente sugiere el inicio de la colonización de las bacterias de la placa subgingival hacia el conducto radicular. Por otro lado, no queda esclarecido cuándo se produce el rompimiento de las barreras físicas que permite la migración de las bacterias a la dentina. Lo que se puede sugerir, es que la microbiota predominante en muestras con necrosis, son similares a los primeros colonizadores de las mucosas y dientes desde la infancia.

Todas las muestras pudieron ser evaluadas por medio de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA, concluyendo que la carga total bacteriana es mayor en las muestras de necrosis en comparación de los grupos de periodontitis apical asintomática y sintomática, posiblemente derivado del tipo de lesión y la forma en que se tomaron las muestras. Sin embargo, podrían utilizarse otras técnicas con mayor sensibilidad para detectar especies patógenas reconocidas y especies no cultivables del microbioma oral humano, que puedan estar presentes en menor cantidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wiley, J.S., *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. 3^o ed. 2020, Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell. 1-2.
2. Bibel, D.J., *The discovery of the oral flora--a 300-year retrospective*. J Am Dent Assoc, 1983. **107**(4): p. 569-70.
3. Miller, W.D., *An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp*. Dent Cosmos, 1894. **36**: p. 505.
4. Kakehashi, S., H.R. Stanley, and R.J. Fitzgerald, *The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1965. **20**: p. 340-9.
5. Wittgow, W.C., Jr. and C.B. Sabiston, Jr., *Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps*. J Endod, 1975. **1**(5): p. 168-71.
6. Moller, A.J., *Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies*. Odontol Tidskr, 1966. **74**(5): p. Suppl:1-380.
7. Bergenholtz, G., *Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth*. Odontol Revy, 1974. **25**(4): p. 347-58.
8. Maisto, O.A., [*Current trends in microbiological control in endodontics*]. Rev Asoc Odontol Argent, 1955. **43**(7): p. 256-62.
9. Sundqvist, G., *Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulp*. Umea Univ Odontological Dissertations, 1976. **7**.
10. Keudell, K., et al., *Microorganisms isolated from pulp chambers*. J Endod, 1976. **2**(5): p. 146-8.
11. Grossman, L.I.e.a., *Correlation of clinical diagnosis and bacteriologic status symptomatically involved pulps*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1968. **25**(2): p. 235-238.
12. Burket, L.W., *Post-mortem bacteriological studies of different areas of human teeth and their supporting structures*. J Dent Res 1942. **21**(9).
13. Grossman, L.I., *Origin of microorganisms in traumatized pulpless, sound teeth*. J Dent Res, 1967. **46**: p. 551.
14. Ostrander, F.D., Crowley, M. C., Dowson, J. , *A Clinical Study of the Treatment of Root Canal and Periapical Infections With Penicillin*. J. D. Res., 1947. **26**: p. 403.
15. Pohto, M., *On the effect of antibiotic substances on the micro-organisms present in dry gangrenes*. Suom Hammaslaak Toim, 1952. **48**(1 Suppl.): p. 29-54.
16. Engstrom, B. and G. Frostell, *Bacteriological studies of the non-vital pulp in cases with intact pulp cavities*. Acta Odontol Scand, 1961. **19**: p. 23-39.
17. Sundqvist, G., E. Johansson, and U. Sjogren, *Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections*. J Endod, 1989. **15**(1): p. 13-9.
18. Lana, M.A., et al., *Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro*. Oral Microbiol Immunol, 2001. **16**(2): p. 100-5.
19. Jacinto, R.C., et al., *Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(5): p. 285-92.
20. Cohen, S., Kenneth, M., *Microbiology and treatment of endodontic infections*, in *Cohen's Pathways of the Pulp*. 2020, Elsevier: Barcelona. p. 557-608.
21. Goldberg, M., Lasfargues, J-J., *Dentin-pulpal complex revisited*. J Dent, 1995. **23**(15).
22. Pashley, D.H., *Potential treatment modalities for dentin hypersensitivity-in office products*, in *Tooth wear and sensitivity*. 2000, Martin-Dunitz Publishers.: London. p. 351.

23. Torneck, C.D., *Dentin-pulp complex*, in *Oral histology: development, structure, and function*. 1998, Mosby: St. Louis. p. 150.
24. Torabinejad, M.W.R.E., *Endodontic Microbiology*, in *Endodontics: Principles and Practice*. 2020, Elsevier Health Sciences. p. 38-48.
25. Bergenholtz, G., *Endodoncia*. 2° ed. Vol. 1. 2011, México: Manual Moderno. 94-95.
26. Garberoglio, R. and M. Brannstrom, *Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules*. Arch Oral Biol, 1976. **21**(6): p. 355-62.
27. Nagaoka, S., et al., *Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth*. J Endod, 1995. **21**(2): p. 70-3.
28. Cvek, M., L. Granath, and M. Lundberg, *Failures and healing in endodontically treated non-vital anterior teeth with posttraumatically reduced pulp lumen*. Acta Odontol Scand, 1982. **40**(4): p. 223-8.
29. Langeland, K., H. Rodrigues, and W. Dowden, *Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1974. **37**(2): p. 257-70.
30. Delivanis, P.D., R.B. Snowden, and R.J. Doyle, *Localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled root canals*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1981. **52**(4): p. 430-2.
31. Delivanis, P.D. and V.S. Fan, *The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals*. J Endod, 1984. **10**(11): p. 521-4.
32. Grossman, L.I., *Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth*. J Dent Res, 1967. **46**(3): p. 551-3.
33. Love, R.M. and H.F. Jenkinson, *Invasion of dentinal tubules by oral bacteria*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(2): p. 171-83.
34. Moller, A.J., et al., *Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys*. Scand J Dent Res, 1981. **89**(6): p. 475-84.
35. Naidorf, I.J., *Inflammation and infection of pulp and periapical tissues*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1972. **34**(3): p. 486-97.
36. Sundqvist, G., *Ecology of the root canal flora*. J Endod, 1992. **18**(9): p. 427-30.
37. Liébana, J., *Microbiología oral*. 1st ed. 1995, Madrid, España. 597-605.
38. Glickman, G.N., *AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives*. J Endod, 2009. **35**(12): p. 1619-20.
39. Torabinejad, M.W.R.E., *Endodontic Microbiology*, in *Endodontics: Principles and Practice*. 2009, Elsevier Health Sciences. p. 4-5.
40. Bergenholtz, G., *Endodoncia*. 2° ed. Vol. 1. 2011, México: Manual Moderno. 4-5.
41. Robbins, S.L., Kumar, V., Cotran, R.S., *Patología humana*. 2018, Elsevier Health Sciences. p. 35,36.
42. Grossman, L., *Práctica Endodóntica*. 1973, Editorial Mundi: Buenos Aires.
43. Leonardo, M.R., *Endodoncia: Tratamiento De Conductos Radiculares. Principios Técnicos Y Biológicos*. . 2005, Artes Médicas Latinoamérica: Sao Paulo. p. 43.
44. Harran, E., *[Effectiveness of biomechanical preparation of the root canal]*. Rev Esp Endodoncia, 1984. **2**(2): p. 59-68.
45. Morse, D.R., *Endodontic microbiology in the 1970s*. Int Endod J, 1981. **14**(2): p. 69-79.
46. Paster, B.J., et al., *The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites*. Periodontol 2000, 2006. **42**: p. 80-7.
47. Sundqvist, G., *Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994. **78**(4): p. 522-30.
48. Gomes, B.P., et al., *Microbiological examination of infected dental root canals*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(2): p. 71-6.

49. Sunde, P.T., et al., *Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy*. J Endod, 2002. **28**(4): p. 304-10.
50. Relman, D.A., *Emerging infections and newly-recognised pathogens*. Neth J Med, 1997. **50**(5): p. 216-20.
51. Parahitiyawa, N.B., et al., *Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions*. Oral Dis, 2010. **16**(2): p. 136-45.
52. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections*. Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(2): p. 112-22.
53. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota*. J Endod, 2005. **31**(7): p. 488-98.
54. Siqueira, J.F., Jr., F.R. Alves, and I.N. Rôças, *Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota*. J Endod, 2011. **37**(11): p. 1499-503.
55. Sundqvist, G., *Associations between microbial species in dental root canal infections*. Oral Microbiol Immunol, 1992. **7**(5): p. 257-62.
56. Gomes, B.P., D.B. Drucker, and J.D. Lilley, *Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms*. Int Endod J, 1994. **27**(6): p. 291-8.
57. Gomes, B.P., D.B. Drucker, and J.D. Lilley, *Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals*. Microbios, 1994. **80**(325): p. 231-43.
58. Hong, B.Y., et al., *Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing*. J Endod, 2013. **39**(9): p. 1136-40.
59. Tzanetakakis, G.N., et al., *Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing*. J Endod, 2015. **41**(8): p. 1226-33.
60. Keskin, C., E. Demiryürek, and E.E. Onuk, *Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections*. J Endod, 2017. **43**(8): p. 1309-1316.
61. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Diversity of endodontic microbiota revisited*. J Dent Res, 2009. **88**(11): p. 969-81.
62. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3314-9.
63. Machado de Oliveira, J.C., et al., *Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(1): p. 14-8.
64. Baumgartner, J.C., et al., *Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction*. J Endod, 2004. **30**(3): p. 141-4.
65. Bouillaguet, S., et al., *Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2374.
66. Baumgartner, J.C. and W.A. Falkler, Jr., *Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals*. J Endod, 1991. **17**(8): p. 380-3.
67. Baumgartner, J.C., et al., *Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections*. J Endod, 1999. **25**(6): p. 413-5.
68. Brito, L.C., et al., *Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 3039-49.
69. Foschi, F., et al., *Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients*. Oral Microbiol Immunol, 2005. **20**(5): p. 289-95.

70. Fouad, A.F., et al., *PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3223-31.
71. Gomes, B.P., J.D. Lilley, and D.B. Drucker, *Clinical significance of dental root canal microflora*. J Dent, 1996. **24**(1-2): p. 47-55.
72. Khemaleelakul, S., J.C. Baumgartner, and S. Pruksakorn, *Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002. **94**(6): p. 746-55.
73. Le Goff, A., et al., *Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp*. Oral Microbiol Immunol, 1997. **12**(5): p. 318-22.
74. Munson, M.A., et al., *Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections*. J Dent Res, 2002. **81**(11): p. 761-6.
75. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(11): p. 3599-606.
76. Saito, D., et al., *Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 1): p. 101-7.
77. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis*. J Endod, 2005. **31**(6): p. 411-23.
78. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(4): p. 266-71.
79. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. **89**(6): p. 744-8.
80. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. **92**(4): p. 451-7.
81. Vickerman, M.M., et al., *Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 1): p. 110-8.
82. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **250**(2): p. 279-85.
83. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Characterization of Dialister species in infected root canals*. J Endod, 2006. **32**(11): p. 1057-61.
84. Rolph, H.J., et al., *Molecular identification of microorganisms from endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(9): p. 3282-9.
85. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Novel bacterial phylotypes in endodontic infections*. J Dent Res, 2005. **84**(6): p. 565-9.
86. Egan, M.W., et al., *Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis*. Int Endod J, 2002. **35**(4): p. 321-9.
87. Vianna, M.E., et al., *Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(4): p. 1274-82.
88. Socransky, S.S., et al., *"Checkerboard" DNA-DNA hybridization*. Biotechniques, 1994. **17**(4): p. 788-92.
89. Smith, G.L., S.S. Socransky, and C. Sansone, *"Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms*. Oral Microbiol Immunol, 1989. **4**(3): p. 141-5.
90. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal Biochem, 1983. **132**(1): p. 6-13.

91. Engler-Blum, G., et al., *Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations*. Anal Biochem, 1993. **210**(2): p. 235-44.
92. *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*. Ann Periodontol, 1999. **4**(1): p. i, 1-112.
93. Cayo-Rojas, C.F., et al., *Microleakage in class II restorations of two bulk fill resin composites and a conventional nanohybrid resin composite: an in vitro study at 10,000 thermocycles*. BMC Oral Health, 2021. **21**(1): p. 619.
94. Baume, L.J., *Dental pulp conditions in relation to carious lesions*. Int Dent J, 1970. **20**(2): p. 309-37.
95. Fouad, A.F., *Microbiological Aspects of Traumatic Injuries*. Journal of Endodontics, 2019. **45**(12): p. S39-S48.
96. Hartroth, B., I. Seyfahrt, and G. Conrads, *Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters*. Oral Microbiol Immunol, 1999. **14**(5): p. 326-30.
97. Nickles, K., et al., *Comparison of Two Different Sampling Methods for Subgingival Plaque: Subgingival Paper Points or Mouthrinse Sample?* J Periodontol, 2017. **88**(4): p. 399-406.
98. Ali, R.W., et al., *Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients*. J Periodontol, 1994. **65**(11): p. 1046-52.
99. Ali, R.W., et al., *Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis*. J Periodontol, 1994. **65**(11): p. 1053-7.
100. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, and J.L. Dzink, *Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(7): p. 440-4.
101. Socransky, S.S., et al., *Associations between microbial species in subgingival plaque samples*. Oral Microbiol Immunol, 1988. **3**(1): p. 1-7.
102. Dumbryte, I., et al., *Three-dimensional non-destructive visualization of teeth enamel microcracks using X-ray micro-computed tomography*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 14810.
103. Hiatt, W.H., *Incomplete Crown-Root Fracture in Pulpal-Periodontal Disease*. Journal of Periodontology, 1973. **44**(6): p. 369-379.
104. Ritchey, B., R. Mendenhall, and B. Orban, *Pulpitis resulting from incomplete tooth fracture*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1957. **10**(6): p. 665-670.
105. Chai, H., J.J.W. Lee, and B.R. Lawn, *Fracture of tooth enamel from incipient microstructural defects*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2010. **3**(1): p. 116-120.
106. Berutti, E., *Microleakage of human saliva through dentinal tubules exposed at the cervical level in teeth treated endodontically*. J Endod, 1996. **22**(11): p. 579-82.
107. Grossman, E.S. and J.A. Hargreaves, *Variable cemento-enamel junction in one person*. Journal of Prosthetic Dentistry, 1991. **65**(1): p. 93-97.
108. Ricucci, D. and J.F. Siqueira, Jr., *Bacteriologic status of non-cavitated proximal enamel caries lesions. A histologic and histobacteriologic study*. J Dent, 2020. **100**: p. 103422.
109. Buonavoglia, A., et al., *Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation*. Odontology, 2013. **101**(1): p. 84-88.
110. Singh, K.K., et al., *Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study*. J Family Med Prim Care, 2020. **9**(8): p. 3965-3969.

111. Sanghavi, T.H., et al., *Investigate the correlation between clinical sign and symptoms and the presence of P. gingivalis, T. denticola, and T. forsythia individually or as a "Red complex" by a multiplex PCR method.* J Conserv Dent, 2014. **17**(6): p. 555-60.
112. Tiwari, S., et al., *Detection of Red complex bacteria, P. gingivalis, T. denticola and T. forsythia in infected root canals and their association with clinical signs and symptoms.* J Family Med Prim Care, 2020. **9**(4): p. 1915-1920.
113. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. **89**(6): p. 744-8.
114. Rôças, I.N., et al., *"Red complex" (Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Treponema denticola) in endodontic infections: a molecular approach.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. **91**(4): p. 468-71.
115. Xia, T. and J.C. Baumgartner, *Occurrence of Actinomyces in infections of endodontic origin.* J Endod, 2003. **29**(9): p. 549-52.
116. Tang, G., et al., *Direct detection of Actinomyces spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique.* J Dent, 2003. **31**(8): p. 559-68.
117. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections.* J Endod, 2002. **28**(3): p. 168-72.
118. Chu, F.C., et al., *Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings.* J Endod, 2006. **32**(1): p. 17-23.
119. Shang, J.J., et al., *Preliminary molecular analysis of bacterial composition in periapical lesions with primary endodontic infections of deciduous teeth.* Chin Med J (Engl), 2013. **126**(16): p. 3112-7.
120. Ruviere, D.B., et al., *Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization.* J Dent Child (Chic), 2007. **74**(2): p. 118-23.
121. Sassone, L.M., et al., *A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary endodontic infections by checkerboard DNA-DNA hybridization.* J Endod, 2012. **38**(7): p. 889-93.
122. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Catonella morbi and Granulicatella adiacens: new species in endodontic infections.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **102**(2): p. 259-64.
123. Sakamoto, M., et al., *Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures.* Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(1): p. 19-23.
124. Siqueira, J.F. and I.N. Rocas, *Positive and negative bacterial associations involving Dialister pneumosintes in primary endodontic infections.* J Endod, 2003. **29**(7): p. 438-41.
125. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Culture-independent detection of Eikenella corrodens and Veillonella parvula in primary endodontic infections.* J Endod, 2006. **32**(6): p. 509-12.
126. Rôças, I.N., J.F. Siqueira, Jr., and K.R. Santos, *Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases.* J Endod, 2004. **30**(5): p. 315-20.
127. Pinheiro, E.T., et al., *Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions.* Int Endod J, 2003. **36**(1): p. 1-11.
128. Fouad, A.F., et al., *Molecular characterization of the presence of Eubacterium spp and Streptococcus spp in endodontic infections.* Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(4): p. 249-55.
129. Hashimura, T., M. Sato, and E. Hoshino, *Detection of Slackia exigua, Mogibacterium timidum and Eubacterium saphenum from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method.* Int Endod J, 2001. **34**(6): p. 463-70.

130. Haapasalo, M., et al., *Black-pigmented Bacteroides spp. in human apical periodontitis*. Infect Immun, 1986. **53**(1): p. 149-53.
131. Xia, T., J.C. Baumgartner, and L.L. David, *Isolation and identification of Prevotella tanneriae from endodontic infections*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(4): p. 273-5.
132. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(4): p. 275-81.
133. Rocas, I.N., et al., *Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR*. Int Endod J, 2003. **36**(1): p. 20-6.
134. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Treponema species associated with abscesses of endodontic origin*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(5): p. 336-9.
135. Baumgartner, J.C., S.U. Khemaleelakul, and T. Xia, *Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections*. J Endod, 2003. **29**(12): p. 794-7.
136. Jung, I.Y., et al., *Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. **92**(3): p. 329-34.
137. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *PCR-based identification of Treponema maltophilum, T amylovorum, T medium, and T lecithinolyticum in primary root canal infections*. Arch Oral Biol, 2003. **48**(7): p. 495-502.
138. Bae, K.S., et al., *Occurrence of Prevotella nigrescens and Prevotella intermedia in infections of endodontic origin*. J Endod, 1997. **23**(10): p. 620-3.
139. Rôças, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Culture-independent detection of Eikenella corrodens and Veillonella parvula in primary endodontic infections*. J Endod, 2006. **32**(6): p. 509-12.
140. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 135-87.

TABLAS

Tabla 1. Especies bacterianas representativos en infecciones endodóncicas.

Género	Especie
<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> [115-118] <i>A. odontolyticus</i> [72, 116-118] <i>A. meyeri</i> [116, 118] <i>A. gerencseriae</i> [116, 117] <i>A. naeslundii</i> [72, 116, 118] <i>A. pyogenes</i> [118] <i>A. viscosus</i> [84, 115]
<i>Aggregatibacter</i>	<i>A. segnis</i> [119]
<i>Anaerococcus</i>	<i>A. prevotii</i> [72]
<i>Atopobium</i>	<i>A. parvulum</i> [62], <i>A. rimae</i> [52]
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. dentium</i> [80, 118]
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. ochracea</i> [118, 120, 121], <i>C. gingivalis</i> [80, 113, 118]
<i>Catonella</i>	<i>C. morbi</i> [122]
<i>Centipeda</i>	<i>C. periodontii</i> [118]
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. haemolyticum</i> [72, 118] <i>C. striatum</i> [72, 118], <i>C. xerosis</i> [72, 118] <i>C. matruchotti</i> [79, 80, 118]
<i>Dialister</i>	<i>D. invisus</i> [52, 62, 74, 82, 123] <i>D. pneumosintes</i> [52, 62, 74, 76, 82, 124]
<i>Eggerthella</i>	<i>E. lenta</i> [72, 118]
<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i> [72, 79, 80, 118, 125]
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> [117, 118, 126, 127]
<i>Eubacterium</i>	<i>E. infirmum</i> [52, 123] <i>E. minutum</i> [128] <i>E. nodatum</i> [128], <i>E. saphenum</i> [129]
<i>Filifactor</i>	<i>F. alocis</i> [52, 55] [123]
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> [18, 52, 55, 70, 72, 118, 123] <i>F. periodonticum</i> [80], <i>F. necrophorum</i> [72, 118] <i>F. varium</i> [118]
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i> [118] <i>G. morbillorum</i> [52, 72, 80, 118]
<i>Granulicatella</i>	<i>G. adiacens</i> [122]
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> [118], <i>L. casei</i> [72] <i>L. fermentum</i> [72], <i>L. rhamnosus</i> [72]
<i>Megasphaera</i>	<i>Megasphaera</i> sp. oral clone CS025/BS073[52]
<i>Mogibacterium</i>	<i>M. timidum</i> [52, 128, 129] <i>M. neglectum</i> [52]
<i>Neisseria</i>	<i>N. mucosa</i> [79, 80, 118]
	<i>N. lactamica</i> [118] <i>N. sicca/subflava</i> [118]
<i>Olsenella</i>	<i>O. uli</i> [62], <i>O. profusa</i> [62]
<i>Parvimonas</i>	<i>P. micra</i> [52, 55]
<i>Peptoniphilus</i>	<i>P. asaccharolyticus</i> [72]
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i> [155]
<i>Porphyromonas</i>	<i>P. endodontalis</i> [52, 118] <i>P. gingivalis</i> [118, 123] <i>P. asaccharolytica</i> [72]
<i>Prevotella</i>	<i>P. intermedia</i> [52, 55, 118, 130] <i>P. nigrescens</i> [67, 70, 72, 130] <i>P. tanneriae</i> [131] <i>P. oralis</i> [52, 72] [118], <i>P. oris</i> [118] <i>P. buccae</i> [72, 118] <i>P. melaninogenica</i> [72, 118] <i>P. denticola</i> [52, 118, 130] <i>P. loescheii</i> [17, 72, 118] <i>P. multissacharivorax</i> [52] <i>P. baroniae</i> [123] <i>P. pallens</i> [62], <i>P. corporis</i> [118]
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. granulosum</i> [118], <i>P. propionicum</i> [55, 118] <i>P. acnes</i> [72, 84, 118]
<i>Pseudoramibacter</i>	<i>P. alactolyticus</i> [52, 55, 123]
<i>Selenomonas</i>	<i>S. sputigena</i> [52, 55]
<i>Slackia</i>	<i>S. exigua</i> [129]
<i>Solobacterium</i>	<i>S. moorei</i> [132]
<i>Streptococcus</i>	<i>S. intermedius</i> [52] [72, 84, 128] <i>S. constellatus</i> [52] [117, 118] <i>S. anginosus</i> [52],[117, 128], <i>S. crista</i> [72] <i>S. oralis</i> [72] [120], <i>S. sanguis</i> [72, 84, 117, 128] <i>S. gordonii</i> [117, 120], <i>S. mitis</i> [72, 117, 118, 120] <i>S. mutans</i> [72, 128], <i>S. salivarius</i> [128] <i>S. sobrinus</i> [72]
<i>Synergistes</i>	<i>Synergistes</i> oral clone BA121[62, 123] <i>Synergistes</i> oral clones BH017/D084[62] <i>Synergistes</i> oral clone W090[62] <i>Synergistes</i> oral clone E3_33[62]
<i>Tannerella</i>	<i>T. forsythia</i> [70, 79, 80]
<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i> [120, 132] <i>T. socranskii</i> [133-135] <i>T. parvum</i> [134-137] <i>T. maltophilum</i> [135] [134, 136, 137] <i>T. lecithinolyticum</i> [134-136] [137] <i>T. pectinovorum</i> [138] <i>T. vincentii</i> [138]
<i>Veillonella</i>	<i>V. párvula</i> [52, 72, 139] <i>V. dispar</i> [118]

Tabla 2. Clasificación clínica de patologías pulpares y periapicales basada en la propuesta de la AAE de diciembre de 2009.

Patologías pulpares	
Pulpa normal	Categoría de diagnóstico clínico, donde el tejido pulpar se encuentra libre de síntomas y responde normalmente a las pruebas de sensibilidad pulpar.
Pulpitis reversible	Diagnóstico clínico basado en hallazgos objetivos y subjetivos, indicando que la inflamación puede resolverse y la pulpa podría regresar a la normalidad.
Pulpitis irreversible sintomática	Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos, que indican que el tejido pulpar en proceso inflamatorio es incapaz de cicatrizar, con características adicionales como dolor persistente a los cambios de temperatura, dolor espontáneo y referido.
Pulpitis irreversible asintomática	Diagnóstico clínico basado en hallazgos subjetivos y objetivos, que indican que la pulpa vital inflamada es incapaz de cicatrizar, con características adicionales como la carencia de sintomatología clínica.
Necrosis pulpar	Categoría de diagnóstico clínico que indica la muerte del tejido pulpar, usualmente presenta respuesta negativa ante los test de sensibilidad.
Previamente tratado	Categoría de diagnóstico clínico que indica que el diente ha sido endodónticamente tratado y los conductos radiculares obturados con diferentes materiales
Tratamiento previamente iniciado	Hallazgo clínico que indica que el diente ha recibido un tratamiento endodóntico parcial, pulpotomía o pulpectomía.
Patologías periapicales	
Tejidos apicales sanos	Diente con tejido perirradicular normal, sin sensibilidad a los test de palpación o percusión. La lámina dura que rodea la raíz está intacta y el espacio del ligamento periodontal es uniforme.
Periodontitis apical sintomática	Inflamación del periodonto apical, relacionada a sintomatología clínica, que incluye respuesta dolorosa a la masticación, percusión o a la palpación, puede o no estar relacionada a patologías de origen pulpar o a necrosis, con o sin asociación de radiolucidez apical.
Periodontitis apical asintomática	Inflamación y destrucción del tejido periapical ocasionada por la evolución de patologías pulpares previas, sin resolución. Se presenta como un área radiolúcida apical, en ausencia de sintomatología clínica.
Absceso apical agudo	Reacción inflamatoria al proceso infeccioso y necrosis del tejido pulpar, caracterizada por su rápido inicio, dolor espontáneo, sensibilidad a la presión dental, formación de pus e inflamación de los tejidos asociados.
Absceso apical crónico	Reacción inflamatoria a la infección y necrosis pulpar, caracterizada por su inicio gradual y la descarga intermitente de pus a través de un tracto sinuoso asociado.
Osteitis condensante	Lesión radiopaca difusa en relación con el ápice radicular, que representa una reacción ósea localizada, como respuesta a un estímulo inflamatorio de baja intensidad y larga evolución

Tabla 3. Cepas de referencia que se utilizarán para la elaboración de sondas de DNA.

Especie	ATCC	Complejo	Especie	ATCC	Complejo
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	Azul	<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Otros
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Azul	<i>Parvimonas micra</i>	33270	Naranja
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12104	Azul	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	25260	Otros
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Morado	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otros
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	Azul	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Rojo
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	*	No-agrupado	<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Naranja	<i>Prevotella loescheii</i>	15930	Otros
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Naranja	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Otros
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Naranja	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Naranja
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	Otros
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	Verde	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528	Otros
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Verde	<i>Selenomonas noxia</i>	43541	No-agrupado
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	Otros	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Amarillo
<i>Dialister pneumosintes</i>	33048	Otros	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Naranja
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Verde	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Amarillo
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Naranja	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Amarillo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Otros	<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Amarillo
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	Otros	<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Amarillo
<i>Filifactor alocis</i>	35896	Otros	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	**	Naranja	<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Rojo
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Naranja	<i>Treponema denticola</i>	35405	Rojo
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Otros	<i>Veillonella parvula</i>	10790	Morado

Las especies se presentan en orden alfabético. *El DNA de los serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sola sonda de DNA. **El DNA de las subespecies nucleatum (25586), polymorphum (10953) y vincentii (49256) fue combinado para generar una sola sonda de DNA. ATCC: Número de referencia del American Type Culture Collection (Rockville, MD, EU). Complejo: Las especies fueron agrupadas lo más similarmente posible a la descripción de complejos microbianos en la placa dentobacteriana subgingival (Socransky et al., 1998, Socransky & Haffajee, 2005) con la siguiente excepción: *C. matruchotii*, *D. pneumosintes*, *E. saburreum*, *E. sulci*, *F. alocis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*, *P. acnes* y *S. artemidis* se encuentran agrupados como "Otros".

Tabla 4. Criterios de selección.

Patología pulpar	N° dientes	Edad	Otros criterios
Necrosis pulpar	≤ 15	≤ 25	- Sin comunicación directa entre cavidad oral y región periapical.
			- Sin lesión periapical radiográficamente visible.
			- Sin pérdida de inserción mayor a 3mm.
			- Sin lesiones periodontales.
			- Sin fístulas.
			- Sin enfermedades sistémicas.
			- Sin toma de antibióticos (3 meses previos).
- Sin embarazo o en lactancia.			

Tabla 5. Descripción de la población de estudio.

	Sujetos de estudio (n=)	Edad (años)	Género (% mujeres)	Dientes muestreados (% posteriores)
Población completa				
Media	49	37.1	59.2	38.8
EEM		15.3		
Rango		13-71		
Necrosis				
Media	11	38.5	54.5	45.5
EEM		19.6		
Rango		13-71		
Periodontitis Apical Aguda				
Media	17	34.1	58.8	29.4
EEM		15.6		
Rango		15-60		
Periodontitis Apical Crónica				
Media	21	38.9	61.9	42.9
EEM		12.2		
Rango		22-62		

Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados (Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney). EEM: Error estándar de la Media.

Tabla 6. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).

Cuentas totales x10 ⁵	N (n=11)		PAA (n=21)		PAS (n=17)		KW	Estadísticas		
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM		MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)
<i>A. georgiae</i>	31.6	31.6	0.7	0.5	0.3	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>A. israelii</i>	1.6	0.7	16.3	7.2	0.3	0.2	ns	ns	ns	ns
<i>A. naeslundii</i>	0.0	0.0	16.5	6.9	3.1	1.2	*	**	ns	ns
<i>A. viscosus</i>	5.2	2.2	1.6	0.7	0.6	0.3	ns	ns	ns	ns
<i>S. anginosus</i>	3.6	1.6	1.0	0.6	0.3	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i>	0.0	0.0	0.9	0.6	1.1	0.7	ns	*	ns	ns
<i>S. intermedius</i>	24.3	6.1	2.4	0.8	0.5	0.4	**	ns	*	ns
<i>S. mitis</i>	0.0	0.0	6.8	4.2	0.2	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>S. oralis</i>	91.4	22.1	1.2	0.5	0.1	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>S. sanguinis</i>	0.0	0.0	9.4	5.2	0.3	0.2	*	*	ns	ns
<i>A. odontolyticus</i>	10.5	0.5	4.4	3.2	0.2	0.1	***	**	***	ns
<i>V. parvula</i>	0.9	0.6	1.4	0.6	0.2	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>C. gingivalis</i>	0.0	0.0	10.3	7.6	0.6	0.3	*	**	ns	ns
<i>C. ochracea</i>	38.1	7.6	0.2	0.2	0.2	0.2	***	**	*	ns
<i>C. sputigena</i>	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>E. corrodens</i>	0.0	0.0	0.4	0.2	0.7	0.3	ns	*	ns	ns
<i>C. gracilis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>C. rectus</i>	0.0	0.0	0.5	0.3	0.8	0.3	ns	ns	*	ns
<i>C. showae</i>	13.5	0.3	0.4	0.2	0.1	0.0	***	***	***	ns
<i>E. nodatum</i>	3.0	3.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>F. nucleatum</i>	0.0	0.0	3.2	2.4	1.5	0.9	ns	ns	ns	ns
<i>F. periodonticum</i>	0.0	0.0	1.6	1.0	0.1	0.0	***	**	ns	*
<i>P. intermedia</i>	0.7	0.7	3.1	2.4	1.6	0.7	ns	ns	ns	ns
<i>P. micra</i>	0.0	0.0	10.0	5.5	0.6	0.4	ns	ns	ns	ns
<i>P. nigrescens</i>	6.4	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	***	***	***	ns
<i>S. constellatus</i>	0.0	0.0	0.9	0.3	0.1	0.1	**	ns	ns	ns
<i>P. gingivalis</i>	0.0	0.0	0.4	0.3	2.0	0.9	*	ns	*	ns
<i>T. denticola</i>	1.2	0.5	0.3	0.1	0.3	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>T. forsythia</i>	0.0	0.0	0.3	0.2	0.6	0.5	ns	ns	ns	ns
<i>A. a.</i>	0.3	0.3	0.1	0.1	0.5	0.3	ns	ns	ns	ns
<i>S. noxia</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	ns	ns	ns	ns
<i>C. matruchotii</i>	NA	NA	16.7	7.6	1.1	0.5	ns	NA	NA	ns
<i>D. pneumosintes</i>	1.7	1.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E. saburreum</i>	1.8	1.3	1.5	1.0	0.4	0.2	ns	ns	ns	ns
<i>E. sulci</i>	NA	NA	16.8	7.1	0.2	0.1	**	NA	NA	**
<i>F. alocis</i>	0.0	0.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>L. buccalis</i>	0.0	0.0	3.2	1.2	0.2	0.1	**	*	ns	*
<i>N. mucosa</i>	3.0	2.0	0.1	0.1	0.1	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>P. acnes</i>	0.0	0.0	0.8	0.5	0.5	0.2	ns	ns	ns	ns
<i>P. asaccharolytica</i>	0.1	0.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. endodontalis</i>	NA	NA	0.3	0.2	0.3	0.2	ns	NA	NA	ns
<i>P. loescheii</i>	0.6	0.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. melaninog.</i>	0.0	0.0	NA	NA	0.2	0.1	ns	NA	ns	NA
<i>S. artemidis</i>	NA	NA	0.6	0.5	6.1	3.8	ns	NA	NA	ns

EEM: Error Estándar de la Media, **KW:** Kruskal Wallis, **MW:** Prueba U de Mann-Whitney, **N:** Necrosis, **PAA:** Periodontitis Apical Asintomática, **PAS:** Periodontitis Apical sintomática, **NA:** No Aplica, **ns:** No Significativo, **p*<0.05, ***p*<0.01 y ****p*<0.001.

Tabla 7. Prevalencia promedio (% sitios colonizados ± EEM) de las 44 especies bacteriana evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).

% de sitios colonizados	N (n=11)		PAA (n=21)		PAS (n=17)		Estadísticas			
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	KW	MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)
<i>A. georgiae</i>	9.1	9.1	21.4	7.4	28.9	10.3	ns	ns	ns	ns
<i>A. israelii</i>	54.5	15.7	55.9	10.4	14.7	8.3	ns	ns	ns	ns
<i>A. naeslundii</i>	0.0	0.0	66.7	8.7	47.1	12.5	*	**	ns	ns
<i>A. viscosus</i>	36.4	15.2	45.2	9.7	41.7	10.5	ns	ns	ns	ns
<i>S. anginosus</i>	36.4	15.2	33.3	10.0	44.6	11.8	ns	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i>	0.0	0.0	45.0	11.7	35.3	11.9	ns	*	ns	ns
<i>S. intermedius</i>	81.8	12.2	64.3	10.4	18.6	8.3	ns	ns	*	ns
<i>S. mitis</i>	0.0	0.0	32.4	10.5	30.4	10.5	ns	ns	ns	ns
<i>S. oralis</i>	63.6	15.2	52.4	10.0	8.8	5.0	ns	ns	ns	ns
<i>S. sanguinis</i>	0.0	0.0	59.5	9.5	29.4	10.6	*	*	ns	ns
<i>A. odontolyticus</i>	100.0	0.0	61.8	10.1	26.5	9.7	**	ns	**	ns
<i>V. parvula</i>	18.2	12.2	47.6	11.2	33.8	10.7	ns	ns	ns	ns
<i>C. gingivalis</i>	0.0	0.0	78.6	10.1	25.5	8.7	**	**	ns	ns
<i>C. ochracea</i>	72.7	14.1	2.4	2.4	13.7	8.1	**	**	ns	ns
<i>C. sputigena</i>	27.3	14.1	15.0	7.6	33.3	10.2	ns	ns	ns	ns
<i>E. corrodens</i>	0.0	0.0	45.0	11.7	38.7	11.5	ns	*	ns	ns
<i>C. gracilis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	10.8	6.5	ns	ns	ns	ns
<i>C. rectus</i>	0.0	0.0	38.1	9.1	46.1	9.9	ns	ns	*	ns
<i>C. showae</i>	100.0	0.0	29.4	9.6	14.7	6.7	***	**	***	ns
<i>E. nodatum</i>	9.1	9.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>F. nucleatum</i>	0.0	0.0	33.3	9.3	41.2	12.3	ns	ns	ns	ns
<i>F. periodonticum</i>	0.0	0.0	65.0	10.7	11.8	6.8	***	**	ns	*
<i>P. intermedia</i>	9.1	9.1	26.2	8.2	28.4	10.5	ns	ns	ns	ns
<i>P. micra</i>	0.0	0.0	52.5	10.6	52.0	11.8	ns	ns	ns	ns
<i>P. nigrescens</i>	100.0	0.0	11.8	6.8	34.3	10.9	***	***	*	ns
<i>S. constellatus</i>	0.0	0.0	59.5	10.7	4.9	3.4	**	*	ns	*
<i>P. gingivalis</i>	0.0	0.0	40.0	14.5	69.6	10.7	*	ns	**	ns
<i>T. denticola</i>	36.4	15.2	17.6	7.4	51.0	11.4	ns	ns	ns	ns
<i>T. forsythia</i>	0.0	0.0	20.6	7.5	13.7	8.1	ns	ns	ns	ns
<i>A. a.</i>	9.1	9.1	14.3	7.0	34.3	11.1	ns	ns	ns	ns
<i>S. noxia</i>	0.0	0.0	2.9	2.9	10.8	6.5	ns	ns	ns	ns
<i>C. matruchoii</i>	NA	NA	78.6	8.1	27.5	10.8	*	NA	NA	*
<i>D. pneumosintes</i>	9.1	9.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E. saburreum</i>	18.2	12.2	45.0	13.8	60.8	11.1	ns	ns	ns	ns
<i>E. sulci</i>	NA	NA	70.6	8.6	23.5	10.6	ns	NA	NA	ns
<i>F. alocis</i>	0.0	0.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>L. buccalis</i>	0.0	0.0	72.7	12.4	14.7	7.3	**	**	ns	*
<i>N. mucosa</i>	18.2	12.2	8.8	4.8	13.7	6.9	ns	ns	ns	ns
<i>P. acnes</i>	0.0	0.0	14.7	7.1	44.6	11.4	ns	ns	ns	ns
<i>P. asaccharolytica</i>	18.2	12.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. endodontalis</i>	NA	NA	45.0	13.8	15.7	6.9	ns	NA	NA	ns
<i>P. loescheii</i>	9.1	9.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. melaninog.</i>	0.0	0.0	NA	NA	18.6	8.3	ns	NA	ns	NA
<i>S. artemidis</i>	NA	NA	19.0	7.3	30.4	9.9	ns	NA	NA	ns

EEM: Error Estándar de la Media, **KW:** Kruskal Wallis, **MW:** Prueba U de Mann-Whitney, **N:** Necrosis, **PAA:** Periodontitis Apical Asintomática, **PAS:** Periodontitis Apical sintomática, **NA:** No Aplica, **ns:** No Significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Tabla 8. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales ± EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).

Proporción %	N (n=11)		PAA (n=21)		PAS (n=17)		Estadísticas			
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	KW	MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)
<i>A. georgiae</i>	4.4	4.4	0.8	0.4	2.1	1.4	ns	ns	ns	ns
<i>A. israelii</i>	1.1	0.5	4.8	1.8	0.4	0.3	ns	ns	ns	ns
<i>A. naeslundii</i>	0.0	0.0	12.5	3.7	14.4	6.3	*	**	ns	ns
<i>A. viscosus</i>	1.5	0.7	0.9	0.3	3.8	1.6	ns	ns	ns	ns
<i>S. anginosus</i>	1.0	0.5	0.9	0.6	0.8	0.3	ns	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i>	0.0	0.0	0.8	0.3	4.3	2.7	ns	*	ns	ns
<i>S. intermedius</i>	9.5	2.5	13.2	5.7	1.4	1.2	ns	ns	ns	ns
<i>S. mitis</i>	0.0	0.0	3.9	2.2	1.9	1.4	ns	ns	ns	ns
<i>S. oralis</i>	30.0	7.6	1.7	0.6	0.1	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>S. sanguinis</i>	0.0	0.0	4.9	1.3	0.8	0.4	*	*	ns	ns
<i>A. odontolyticus</i>	9.9	3.4	3.3	2.0	2.1	1.2	*	ns	*	ns
<i>V. parvula</i>	0.2	0.1	2.9	1.5	6.8	4.2	ns	ns	ns	ns
<i>C. gingivalis</i>	0.0	0.0	2.8	1.8	1.3	0.6	*	**	ns	ns
<i>C. ochracea</i>	14.8	3.8	0.1	0.1	0.2	0.1	***	**	*	ns
<i>C. sputigena</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.8	ns	ns	ns	ns
<i>E. corrodens</i>	0.0	0.0	1.5	0.7	1.3	0.4	ns	*	ns	ns
<i>C. gracilis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>C. rectus</i>	0.0	0.0	1.9	1.6	5.5	1.6	*	ns	*	ns
<i>C. showae</i>	12.2	3.9	0.6	0.4	0.3	0.2	***	**	***	ns
<i>E. nodatum</i>	4.7	4.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>F. nucleatum</i>	0.0	0.0	1.1	0.6	3.8	1.7	ns	ns	ns	ns
<i>F. periodonticum</i>	0.0	0.0	3.6	0.9	0.3	0.2	***	**	ns	**
<i>P. intermedia</i>	1.4	1.4	3.0	1.5	2.9	1.1	ns	ns	ns	ns
<i>P. micra</i>	0.0	0.0	7.1	2.6	5.2	2.0	ns	ns	ns	ns
<i>P. nigrescens</i>	5.9	2.0	0.1	0.0	0.8	0.3	***	***	**	ns
<i>S. constellatus</i>	0.0	0.0	5.5	2.0	0.1	0.1	**	ns	ns	ns
<i>P. gingivalis</i>	0.0	0.0	0.5	0.3	8.6	2.0	**	ns	*	ns
<i>T. denticola</i>	0.6	0.3	0.1	0.1	1.6	0.5	ns	ns	ns	ns
<i>T. forsythia</i>	0.0	0.0	0.3	0.2	2.0	1.5	ns	ns	ns	ns
<i>A. a.</i>	0.2	0.2	0.1	0.0	2.3	1.2	ns	ns	ns	ns
<i>S. noxia</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>C. matrucotii</i>	NA	NA	11.3	2.9	1.6	0.7	*	NA	NA	*
<i>D. pneumosintes</i>	0.2	0.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E. saburreum</i>	0.3	0.2	6.8	5.0	7.6	2.6	ns	ns	ns	ns
<i>E. sulci</i>	NA	NA	11.3	3.5	0.4	0.2	**	NA	NA	**
<i>F. alocis</i>	0.0	0.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>L. buccalis</i>	0.0	0.0	8.2	3.9	0.4	0.3	**	*	ns	*
<i>N. mucosa</i>	0.7	0.5	0.0	0.0	0.1	0.1	ns	ns	ns	ns
<i>P. acnes</i>	0.0	0.0	0.6	0.4	4.1	3.0	ns	ns	ns	ns
<i>P. asaccharolytica</i>	0.0	0.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. endodontalis</i>	NA	NA	0.7	0.5	0.3	0.1	ns	NA	NA	ns
<i>P. loescheii</i>	1.3	1.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. melaninog.</i>	0.0	0.0	NA	NA	0.3	0.1	ns	NA	ns	NA
<i>S. artemidis</i>	NA	NA	0.5	0.2	5.4	2.6	ns	NA	NA	ns

EEM: Error Estándar de la Media, **KW:** Kruskal Wallis, **MW:** Prueba U de Mann-Whitney, **N:** Necrosis, **PAA:** Periodontitis Apical Asintomática, **PAS:** Periodontitis Apical sintomática, **NA:** No Aplica, **ns:** No Significativo, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

Tabla 9. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).

COMPLEJOS		N (n=11)		PAA (n=21)		PAS (n=17)		Estadísticas			
Clave complejo	Complejo	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	KW	MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)
1	<i>Actinomyces</i> sp.	7.0	4.4	18.1	4.7	19.8	6.1	ns	ns	ns	ns
2	Amarillo	40.5	9.2	24.2	5.6	7.5	2.7	*	ns	*	*
3	Morado	10.1	3.4	5.6	2.0	8.3	3.4	ns	ns	ns	ns
4	Verde	14.8	3.8	1.7	0.7	4.8	1.5	*	*	ns	ns
5	Naranja	24.2	8.7	20.5	2.8	20.6	4.0	ns	ns	ns	ns
6	Rojo	0.6	0.3	0.5	0.2	10.4	2.0	***	ns	***	***
7	No-agrupado	0.2	0.2	0.1	0.0	2.6	1.2	ns	ns	ns	ns
8	Otros	2.5	1.4	29.2	4.3	26.0	4.8	***	***	***	ns

EEM: Error Estándar de la Media, **KW:** Kruskal Wallis, **MW:** Prueba U de Mann-Whitney, **N:** Necrosis, **PAA:** Periodontitis Apical Asintomática, **PAS:** Periodontitis Apical Sintomática, **NA:** No Aplica, **ns:** No Significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Tabla 10. Niveles totales promedio y prevalencia total promedio (cuentas bacterianas totales $\times 10^5 \pm$ EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de necrosis (N), periodontitis apical asintomática (PAA) y periodontitis apical sintomática (PAS).

	CUENTAS TOTALES PROMEDIO						PREVALENCIA TOTAL PROMEDIO					
	Media	EEM	KW	MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)	Media	EEM	KW	MW (N vs PAA)	MW (N vs PAS)	MW (PAA vs PAS)
Necrosis	239.7	58.0	**	*	***	ns	20.9	2.5	ns	ns	ns	ns
PAA	113.8	36.6	ns	ns	ns	ns	36.4	4.9	ns	ns	ns	ns
PAS	27.5	11.1	ns	ns	ns	ns	29.7	5.9	ns	ns	ns	ns

EEM: Error Estándar de la Media, **KW:** Kruskal Wallis, **MW:** Prueba U de Mann-Whitney, **N:** Necrosis, **PAA:** Periodontitis Apical Asintomática, **PAS:** Periodontitis Apical Sintomática, **NA:** No Aplica, **ns:** No Significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

FIGURAS

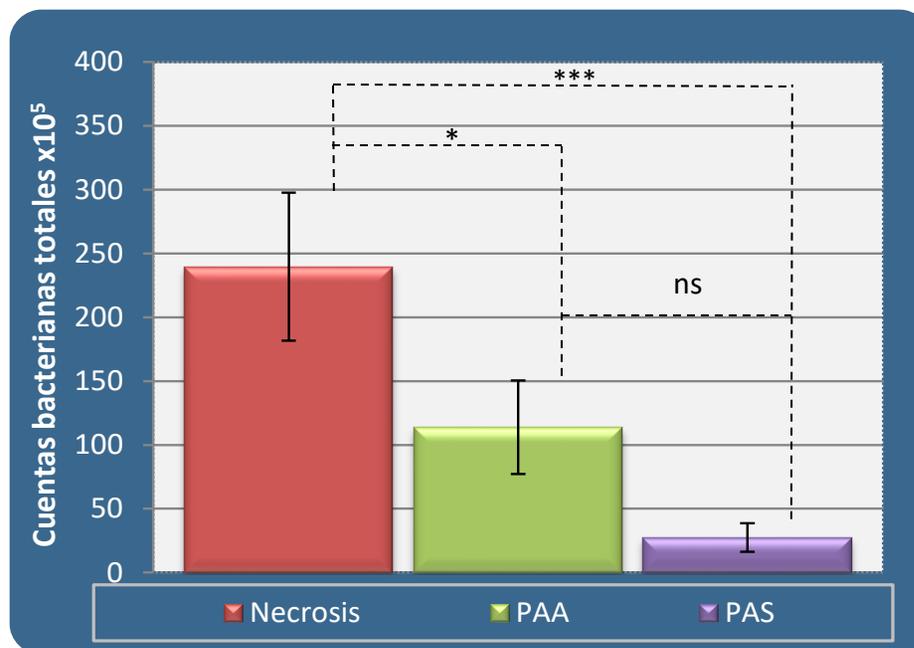


Figura 1. Niveles totales promedio (cuentas bacterianas totales $\times 10^5 \pm$ EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de Necrosis (N), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en la muestra de cada diente, promediados entre las muestras de cada lesión, obteniendo posteriormente la sumatoria del promedio de cuentas de todas las especies evaluadas y finalmente el promedio de las sumatorias entre los dientes de cada grupo de estudio. Las diferencias entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones entre grupos N vs PAA * $p < 0.05$, N vs PAS *** $p < 0.01$ y PAA vs PAS ns. (prueba U de Mann-Whitney).

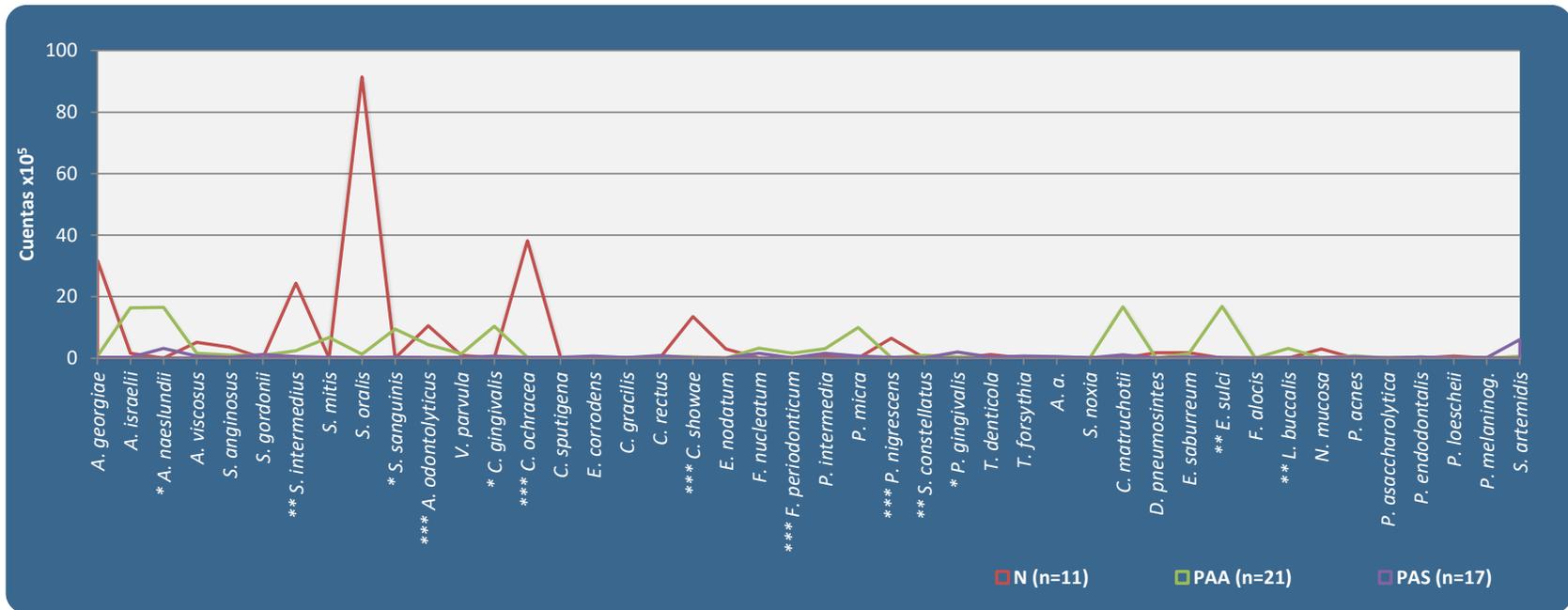


Figura 2. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de Necrosis (N), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en la muestra de cada diente, promediados entre las muestras de cada lesión y posteriormente entre los grupos de estudio. Las diferencias entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones múltiples * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 (Kruskal Wallis). Las significancias de las comparaciones entre grupos se muestran en la [Tabla 6](#).

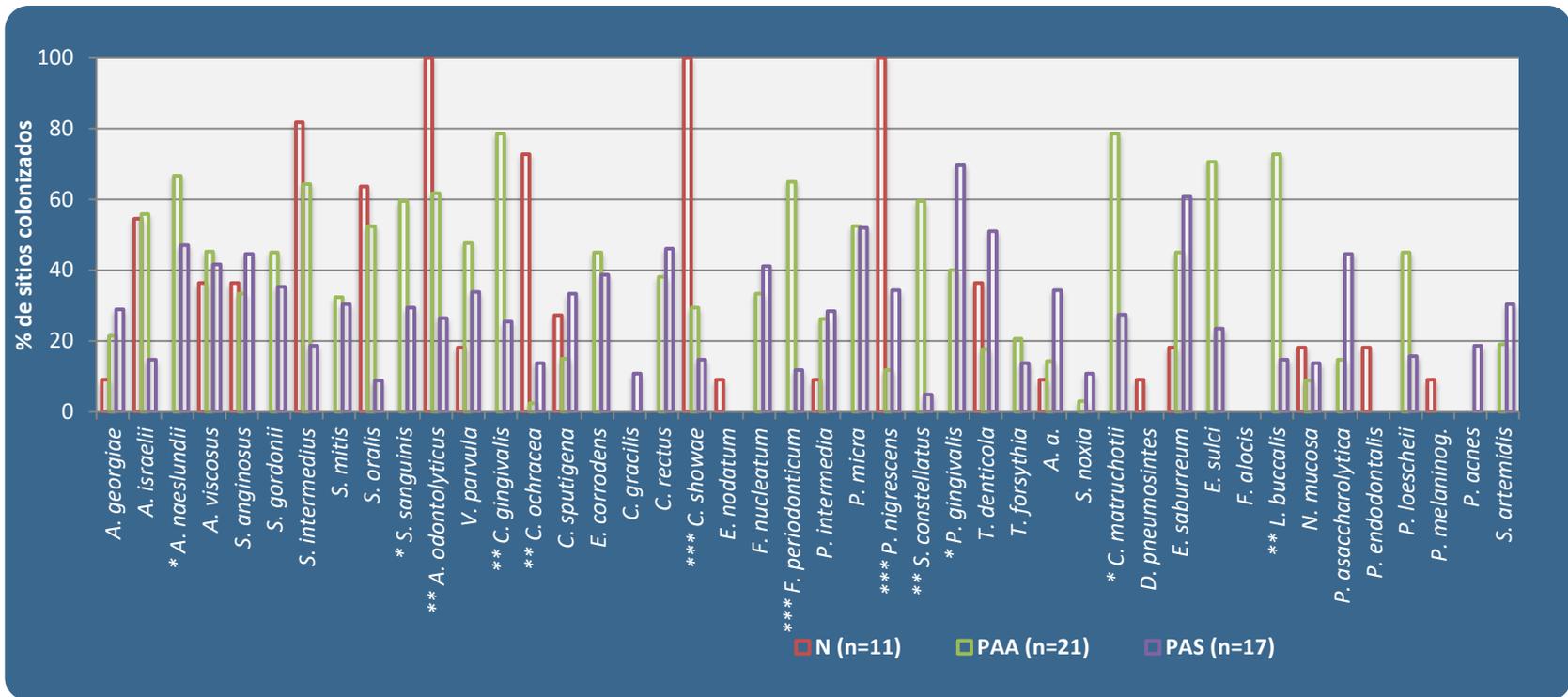


Figura 3. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de Necrosis (N), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS). La prevalencia fue calculada determinada para cada especie en la muestra de cada diente, promediada entre las muestras de cada lesión y posteriormente entre los grupos de estudio. Las diferencias entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). Las significancias de las comparaciones entre grupos se muestran en la [Tabla 7](#).

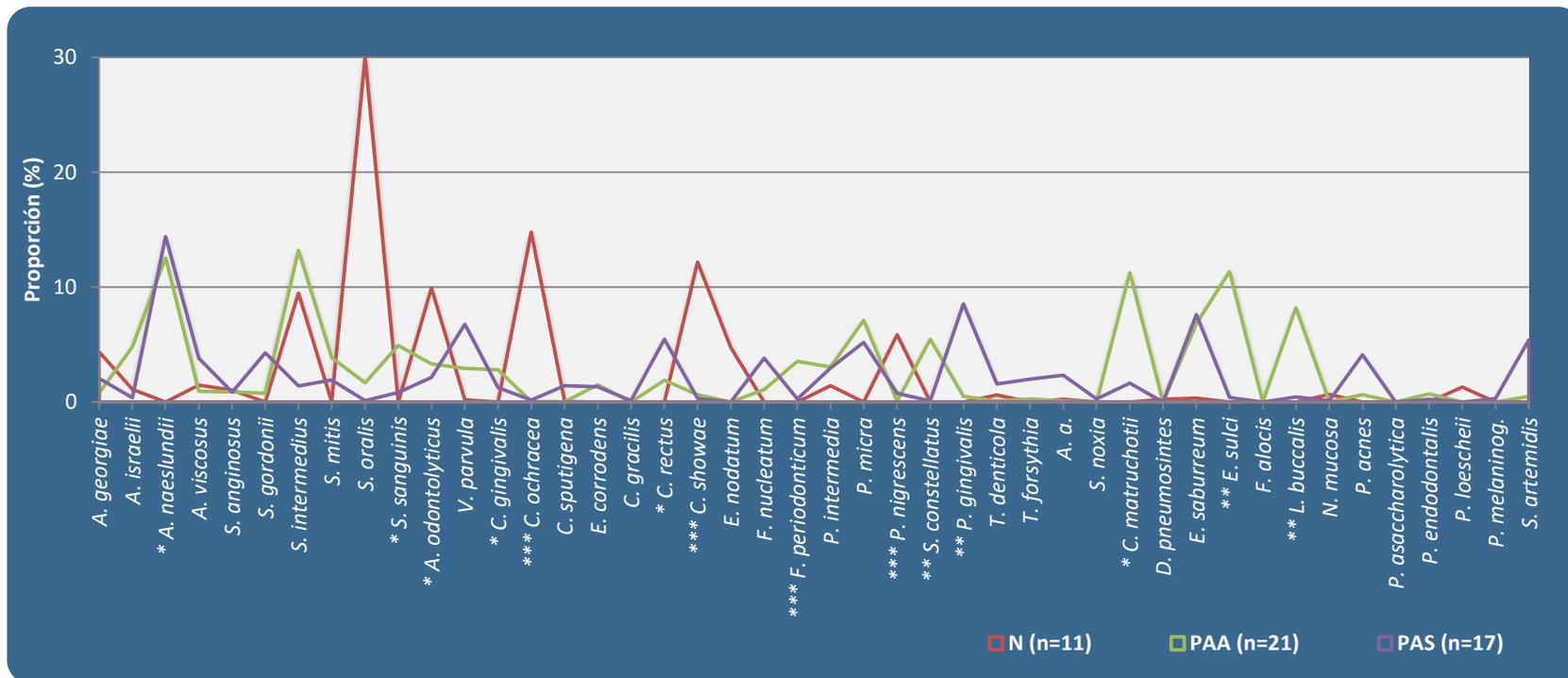


Figura 4. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de las 44 especies bacterianas evaluadas en muestras de Necrosis (N), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS). La proporción fue calculada determinada para cada especie en la muestra de cada diente, promediada entre las muestras de cada lesión y posteriormente entre los grupos de estudio. Las diferencias entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). Las significancias de las comparaciones entre grupos se muestran en la [Tabla 8](#).

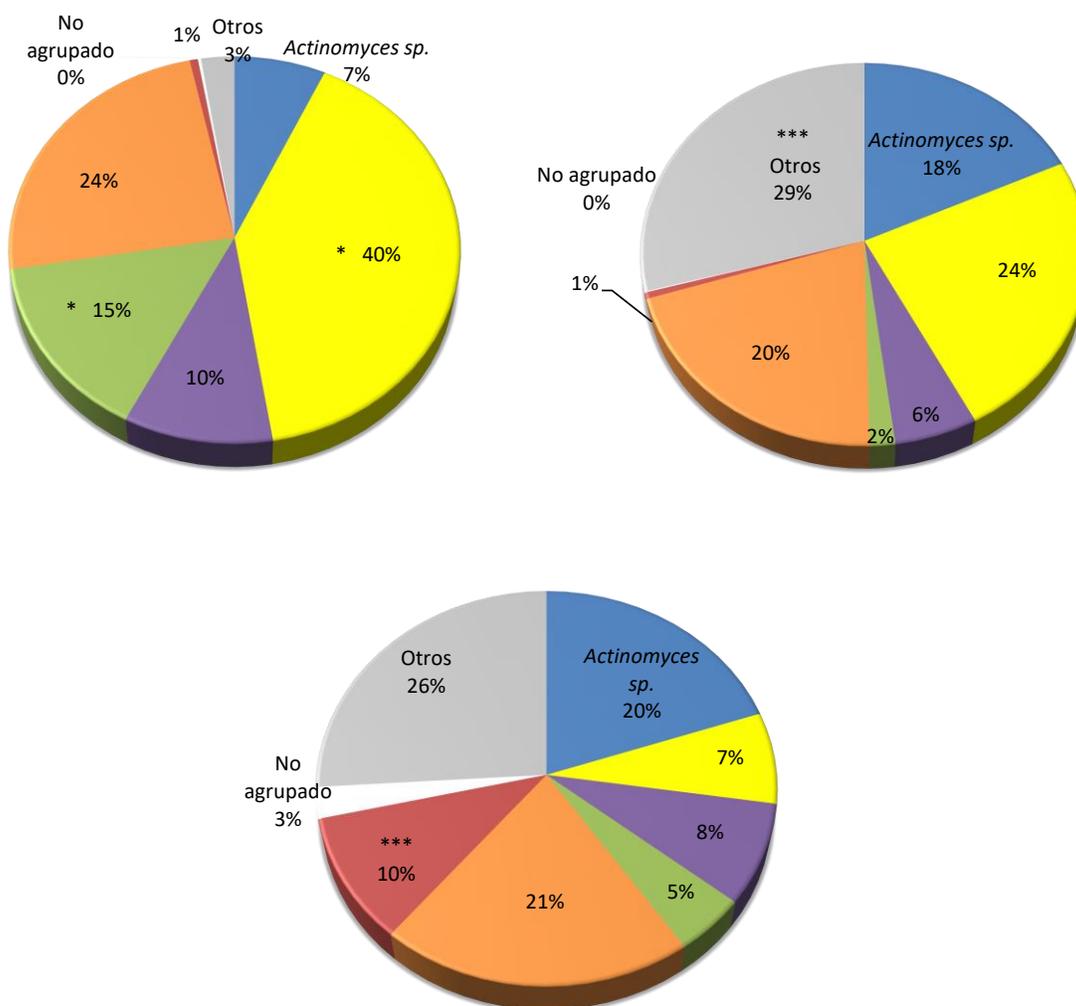


Figura 5. Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras de Necrosis (N), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Periodontitis Apical Sintomática (PAS). Las 44 especies bacterianas evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival[140] (las excepciones se describen en la **Tabla 3**). Las diferencias entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones múltiples * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). La significancia de las diferencias entre los grupos se presenta en la **Tabla 9**.

ANEXOS

Anexo 1. Formato de consentimiento informado.

Laboratorio de Genética Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México

FORMATOS ESPECÍFICOS Consentimiento informado



FE-GMLIFO-002 (0)
SECCIÓN ISO: 4.2

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

CLÍNICOS RESPONSABLES:

- MC. Adriana-Patricia Rodríguez-Hernández.
- Daniela Flores Arellano.
- Esp. CD. Gustavo Francisco Argüello Regalado.

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular.
División de Estudios de Posgrado e Investigación.
Facultad de Odontología, UNAM.

TELÉFONO: 5622-5565 (horas y días hábiles)

E-MAIL: lximenez@post.harvard.edu

TÍTULO DEL PROYECTO: Descripción de la composición microbiológica de conductos radiculares con necrosis pulpar sin lesión periapical.

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que analiza las bacterias que se encuentran dentro de su diente con nervio muerto.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del estudio son determinar la presencia de las bacterias que están dentro de su diente con nervio muerto.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en el estudio debe haber nacido en la República Mexicana, no debe padecer ninguna enfermedad importante, debe tener por lo menos 15 dientes naturales en su boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento endodóntico en el pasado en el diente que se va a estudiar y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Además si es mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en este estudio de investigación requiere que se le realicen uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La realización de una evaluación endodóntica completa**, la cual consistirá en realizar pruebas térmicas (con calor y frío) y de percusión (golpeteos en el diente involucrado).
- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008
COPANT/ISO 9001:2008
NMX-CC-9001-IMNC-2008

Iniciales del paciente

Círculo Institutos
04510 Cd. Universitaria, D.F.

FE-GMLIFO-005



FORMATOS ESPECÍFICOS Consentimiento informado

- **La toma de un máximo de 3 muestras del diente afectado**, lo cual se realizará tomando con unas puntas de papel, muestras de los restos pulpares que contienen bacterias. Dicho procedimiento consiste en realizarle una limpieza dental con copa de hule y pasta al diente a evaluar y a los dos cada lado. Al terminar esto se le pedirá que realice un enjuague bucal por 30 segundos con 15 ml de solución de clorhexidina y gluconato al 12% y después se le administrará el anestésico local. Posteriormente el diente será aislado con dique de hule y se realizará un acceso con pieza de mano de alta velocidad. Después se insertará en el diente una lima que después será retirada. A continuación se introducirán 2 puntas de papel en su diente y permanecerán ahí 20 segundos cada una y serán retiradas.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas y que en este estudio participarán aproximadamente 100 (cien) personas.

Usted debe entender que su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación endodóntica que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de su diente. Las muestras de la pulpa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una endodoncia.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las especies bacterianas que están presentes cuando la pulpa dental muere, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dicha enfermedad, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COMPENSACIONES: Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta





FORMATOS ESPECÍFICOS Consentimiento informado

confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

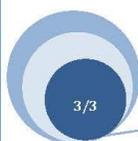
RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

DERECHOS: Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en este estudio de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

ACUERDO: Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en este estudio. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma del Paciente	_____ Fecha (Día/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Día/mes/año)

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008
COPANT/ISO 9001-2008
NMX-CC-9001-IMNC-2008

Iniciales del paciente

Círculo Institutos
04510 Cd. Universitaria, D.F.

FE-GMLIFO-005