



Microbiota de las infecciones endo - pulpar

Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández

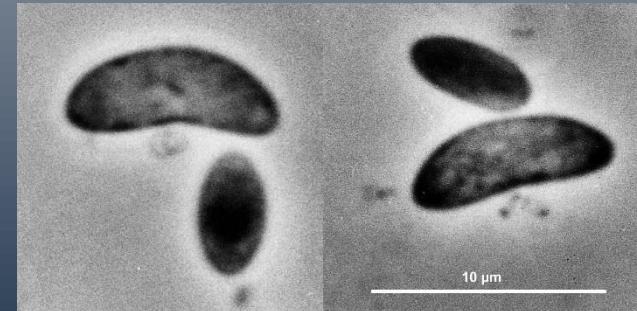
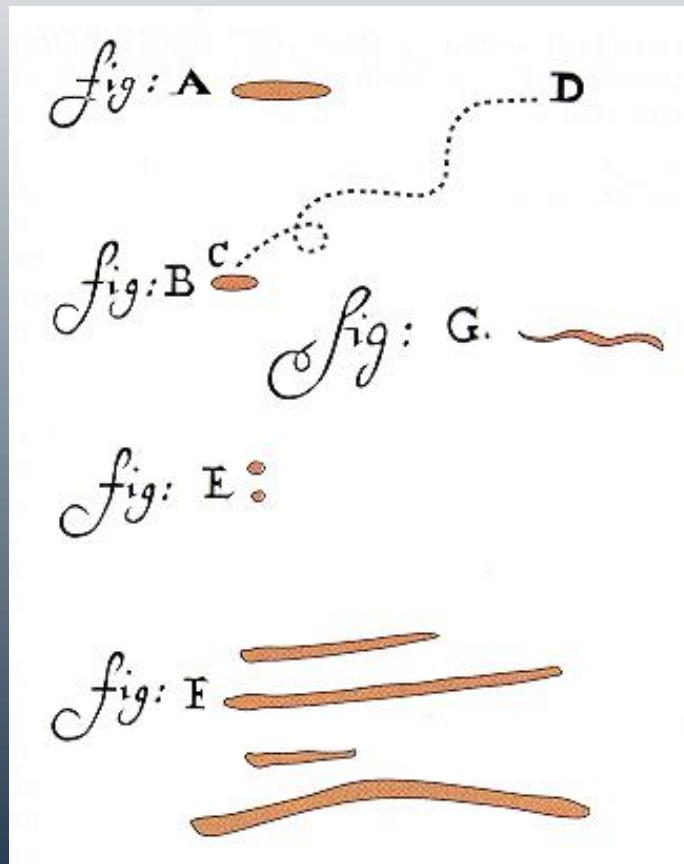
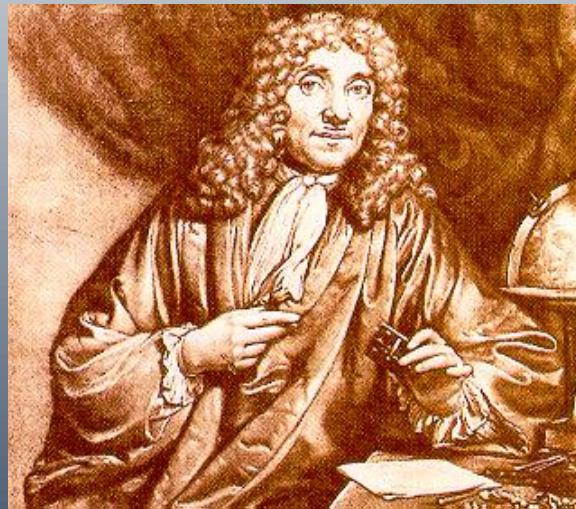


- Historia de la microbiología endodóncica
- Microbioma oral humano
- Filogenia de las especies de la cavidad oral
- Técnicas de identificación microbiana
- Etiología de las infecciones endodóncicas
- Principales microorganismos de infecciones endo - pulpare

Historia de la microbiología oral (1632-1723)



- Anton van Leeuwenhoek. Naturista Holandés quien describe por primera vez la composición de la placa dentobacteriana

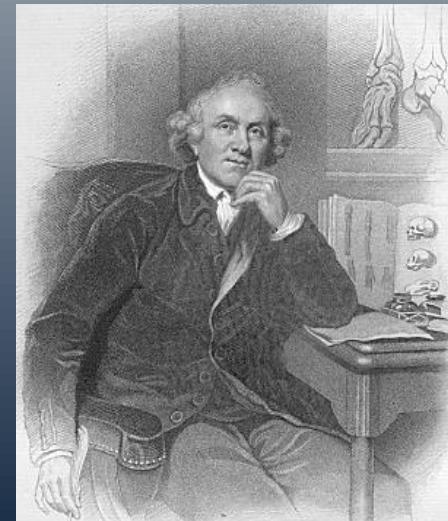
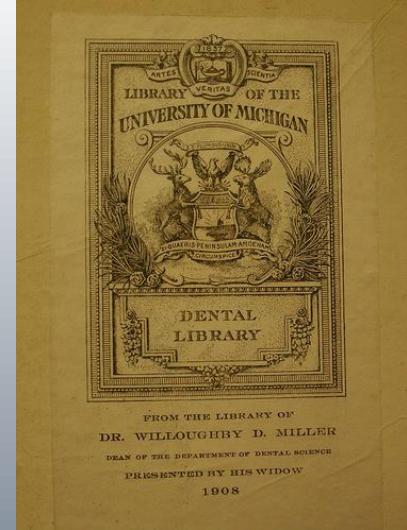
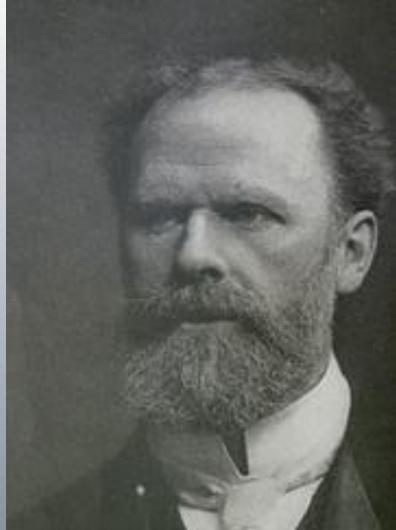


Historia de la microbiología endodóncica (1890-1910)



- En 1890 Willoughby D. Miller (dentista alemán) conocido como el padre de la microbiología oral describe los efectos de las “pulpas dentales gangrenadas como centros de infección”.
- En sus estudios realizados en el laboratorio de R. Koch, cultivó bacterias de infecciones endodónticas y describió su asociación con periodontitis apical.
- En 1910 William Hunter (médico londinense) aseguró que diversas enfermedades crónicas se curaban después de eliminar el foco de infección.
- Publicó un libro que centró el interés en los dientes infectados, describiendo a las coronas de oro como un foco de infección.

“A mausoleum of gold over a mass of sepsis”



Tratamientos endodóncicos (1900-1932)



- Ya en S. XVII, Pierre Fouchard documentó el tratamiento de conductos a base de obturaciones con plomo, sin mucho éxito.
- E.C. Rosenow en 1909 describe la teoría de la “infección focal”, provocando a través de una bacteremia un foco de infección artificial en un órgano dental. Estos autores provocaron un verdadero impacto en la época, inaugurando una fase de oscurantismo en la endodoncia, impulsando la exodoncia.
- Coolidge y col. 1932, mostraron la necesidad de un mayor respeto por los tejidos periapicales “En la era de la investigación biológica”
- Mediante técnicas de asepsia para el tratamiento endodóncico, el Dr. Louis Grossman demostró la carencia de crecimiento bacteriano en cultivos de dientes previamente tratados.

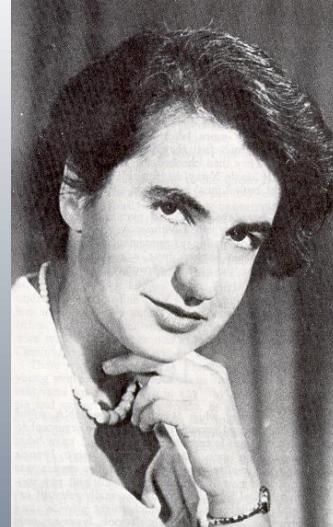




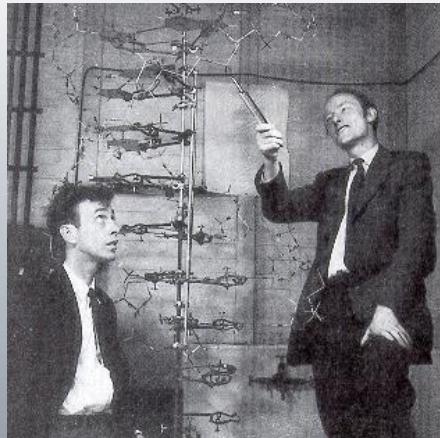
Descubrimiento de la estructura del DNA



Watson JD, Crick FH. *Nature* 1974.



Rosalin Franklin



1953 Watson y Crick



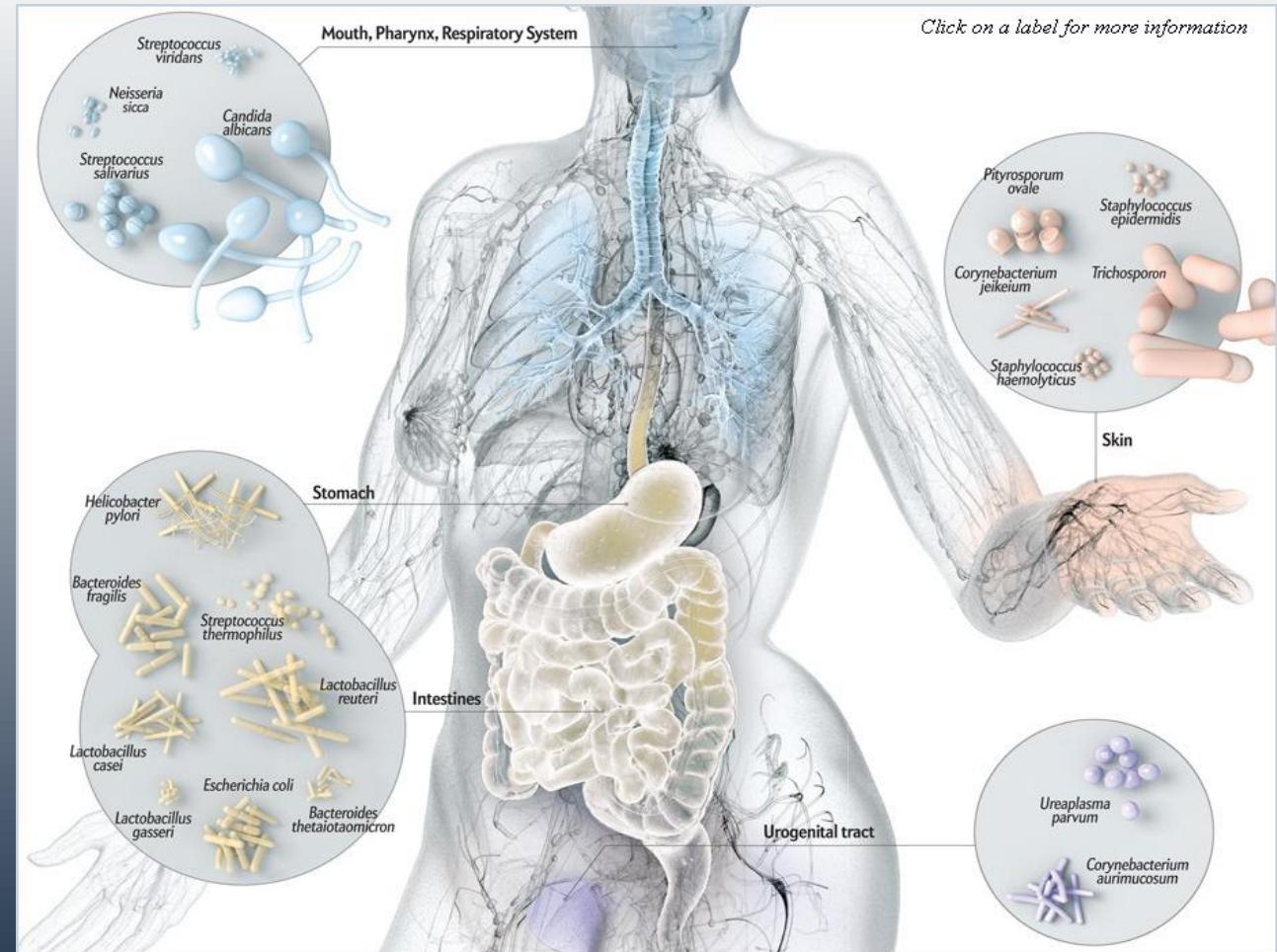
Maurice Wilkins

Microbioma oral humano

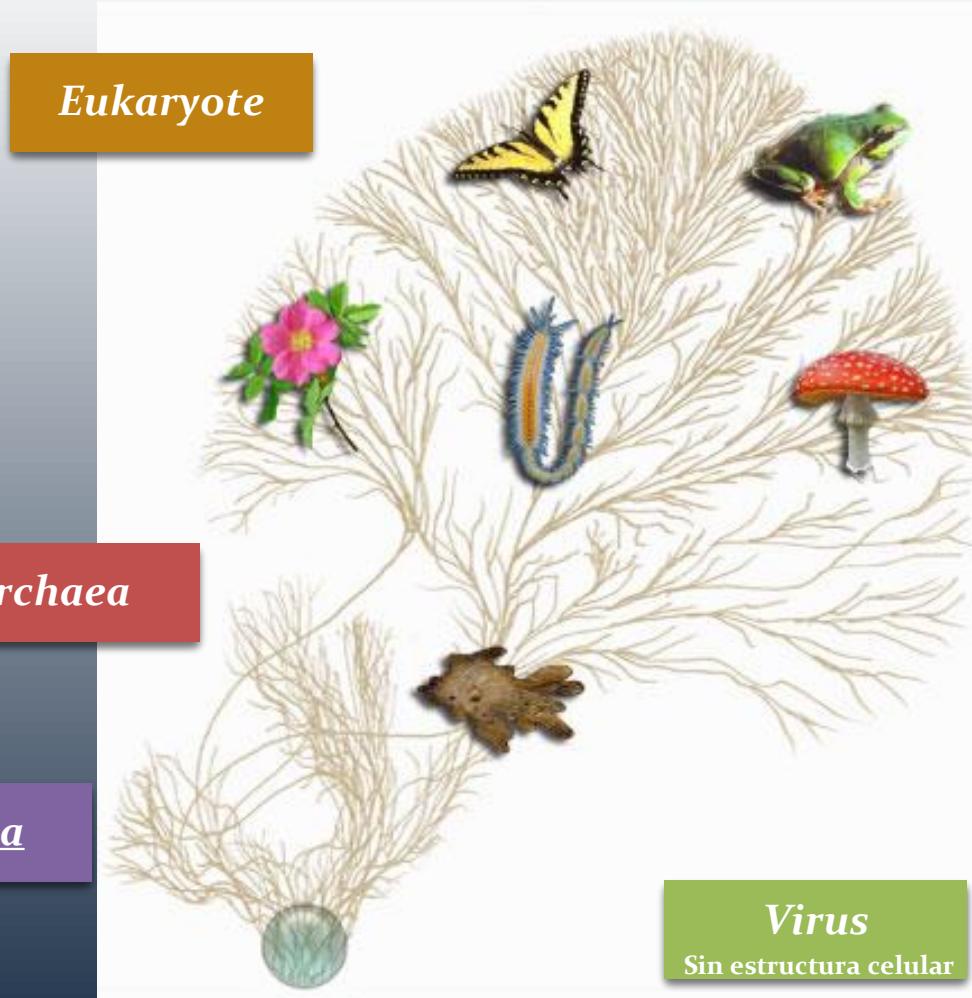
Microbioma

“Comunidad ecológica simbiótica de microorganismos comensales y patógenos que comparten un espacio corporal y que son determinantes de salud y enfermedad”

- El cuerpo humano se encuentra colonizado por 10 veces más células microbianas que células propias
- La cavidad oral representa el 26% del microbioma humano
- La boca alberga alrededor de 700 especies bacterianas



Filogenia de las especies



Lo que nos debemos preguntar:

- ¿Qué microorganismos están presentes en la cavidad oral?
- ¿Porqué los microorganismos están presentes?
- ¿Cómo se pueden identificar si hay algunos que no son cultivables?
- ¿Cuál es su organización espacial?

¿Qué microorganismos están presentes en infeciones pulparas?



Eukaryote (Hongos)



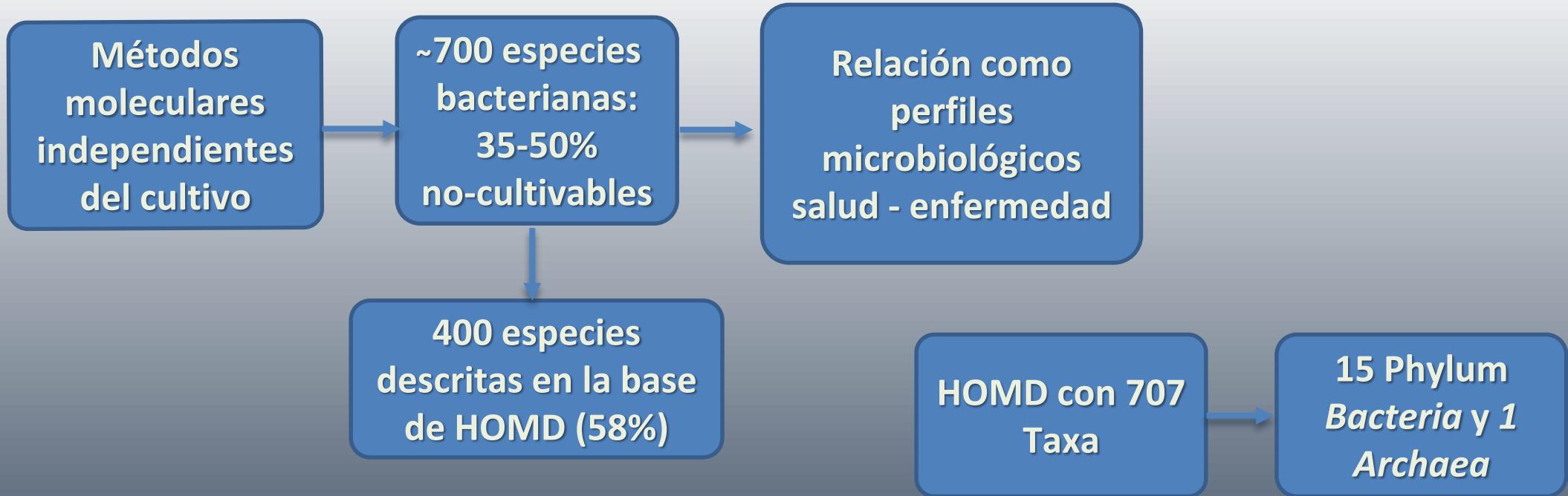
Archaea



Virus

Bacteria



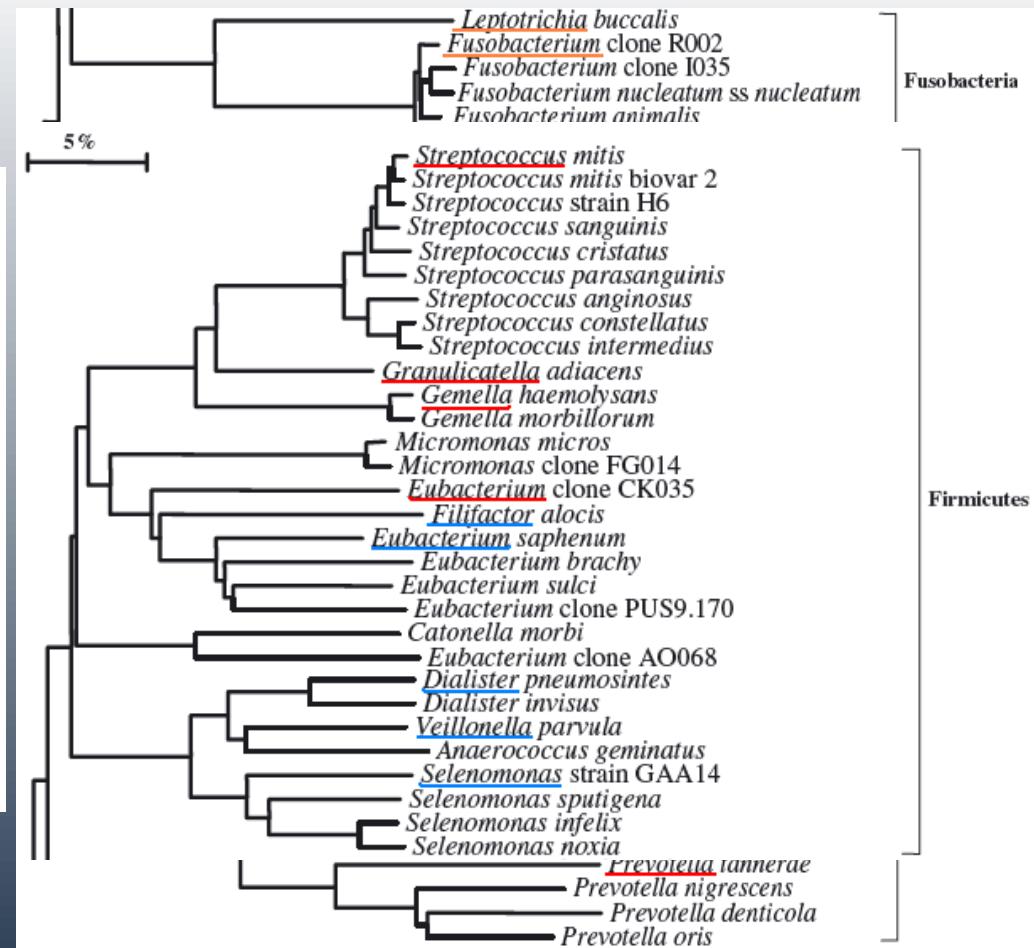


Promueve a la comunidad científica información exhaustiva de géneros y especies bacterianas cultivables y no cultivables de la cavidad oral, así como su relación con el proceso de salud - enfermedad y con infecciones de tipo endógena.

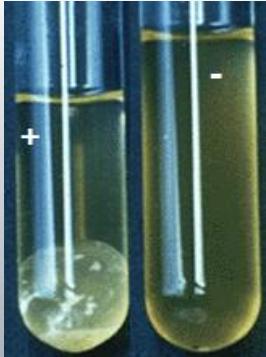
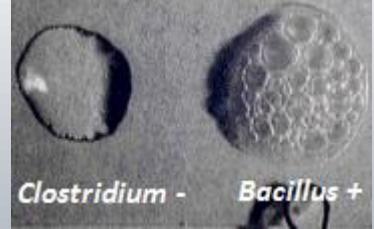
Filogenia de las especies de la cavidad oral

TABLE 1. Phylogenetic distribution of 619 taxa in HOMD version 10

Phylum	No. (%) of:			
	Taxa ^a	Named species ^b	Unnamed cultivated taxa ^c	Unnamed uncultivated taxa ^d
Bacteria				
Firmicutes	227 (36.7)	120 (52.9)	45 (19.8)	62 (27.3)
Bacteroidetes	107 (17.3)	39 (36.4)	27 (25.2)	41 (38.3)
Proteobacteria	106 (17.1)	70 (66.0)	9 (8.5)	27 (25.5)
Actinobacteria	72 (11.6)	37 (51.4)	25 (34.7)	10 (13.9)
Spirochaetes	49 (7.9)	11 (22.4)	3 (6.1)	35 (71.4)
Fusobacteria	32 (5.2)	12 (37.5)	4 (12.5)	16 (50.0)
TM7	12 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)
Synergistetes	10 (1.6)	2 (20.0)	0 (0.0)	8 (80.0)
Chlamydiae	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Chloroflexi	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
SR1	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Archaea				
Euryarchaeota	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	619 (100)	293 (47.3)	113 (18.3)	213 (34.4)

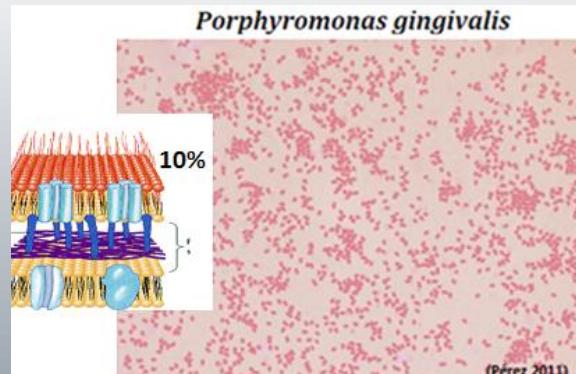


Métodos de identificación (Fenotípica)

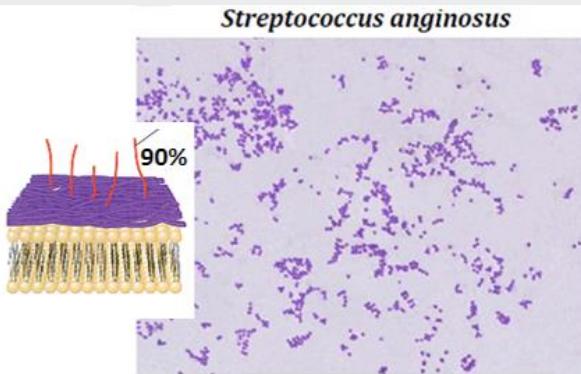


	Cianobacteria
	$8 \times 50\mu\text{m}$
	Streptococcus
	$0.5 - 0.8\mu\text{m}$ diámetro
	Bacillus
	$0.5 - 4\mu\text{m} \times <15\mu\text{m}$
	Treponema
	$0.2 \times 6-14\mu\text{m}$
	A. israelii
	$0.7 - 0.9\mu\text{m}$ diámetro

Microscopía



Campo claro con Tinción de Gram (100X)



(Pérez 2011)



Campo oscuro (100x)



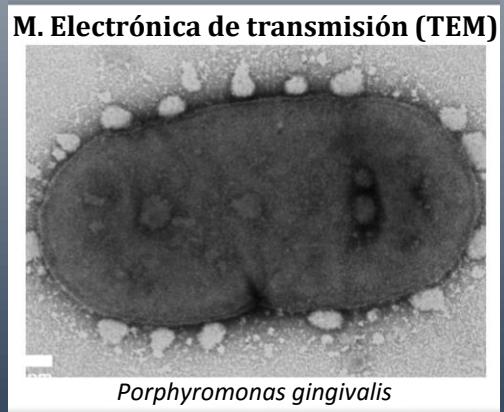
T. D. Brock
Micrografía de contraste de fases

Fusobacterium nucleatum



(Pérez 2011)

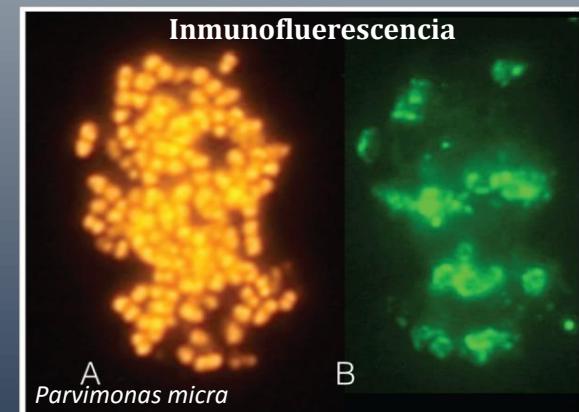
Identificación microbiana



Porphyromonas gingivalis

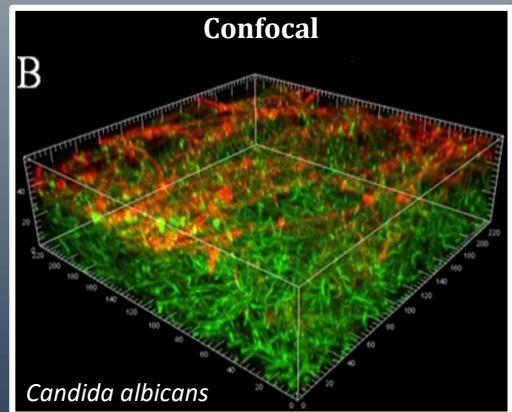


E. faecalis en túbulos dentinarios



A *Parvimonas micra*

B

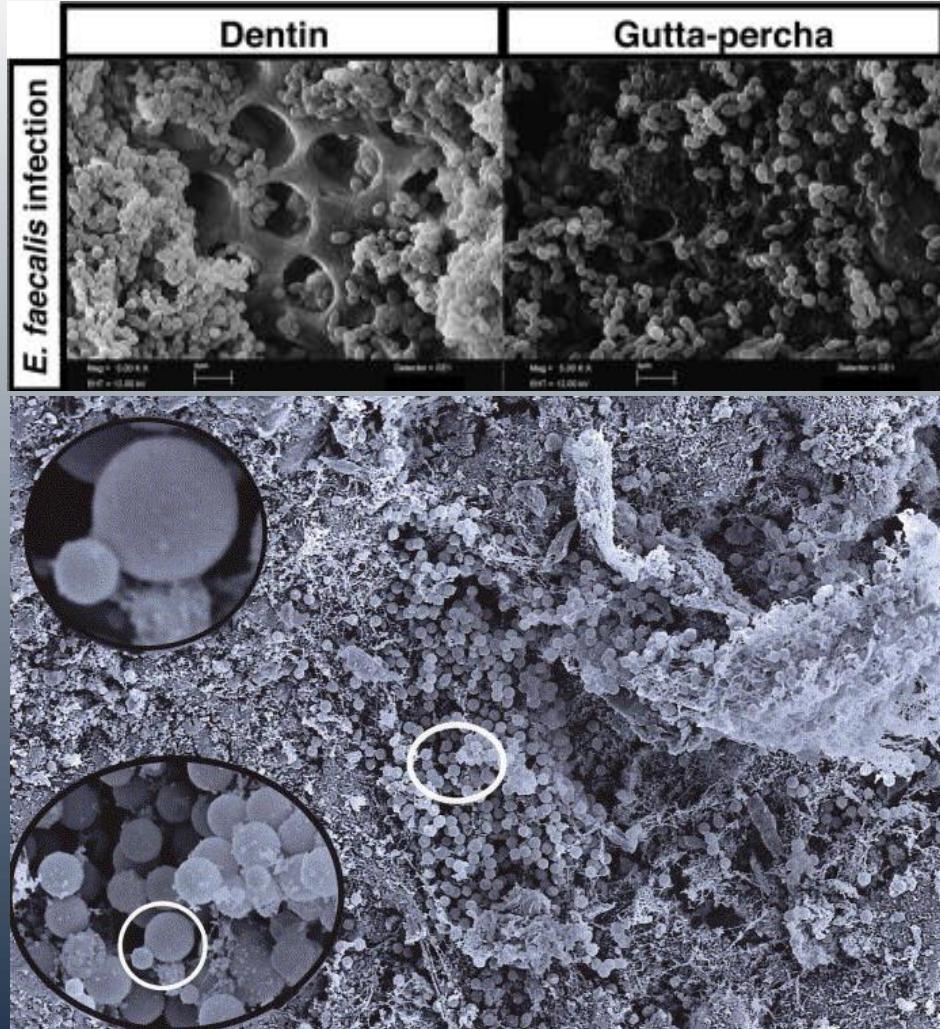


Candida albicans

Microscopía



- Microscopía Electrónica de Barrido del conducto radicular y de formación de una biopelícula de 72h *in-vitro* de *Enterococcus faecalis* recuperada de dentina y gutapercha de un diente extraído por fracaso endodóncico.
- Colonización por levaduras (*Candida albicans*) en el conducto radicular de diente extraido con lesión perirradicular.



Técnicas de identificación microbiana (Genotípicas)



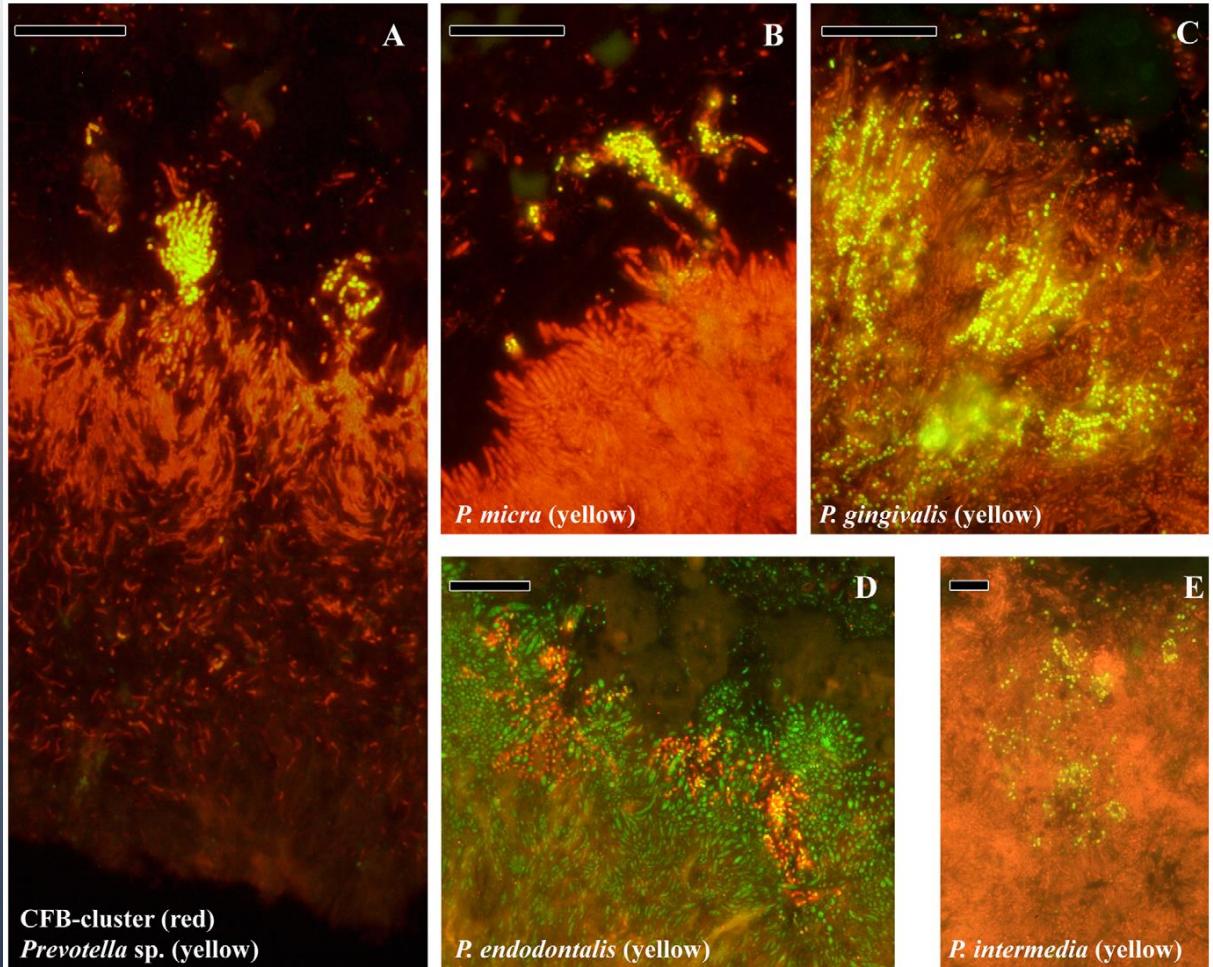
- **Hibridación in-situ (FISH)**
- **Hibridaciones DNA-DNA**
- **PCR**
- **Secuenciación 16S rRNA**



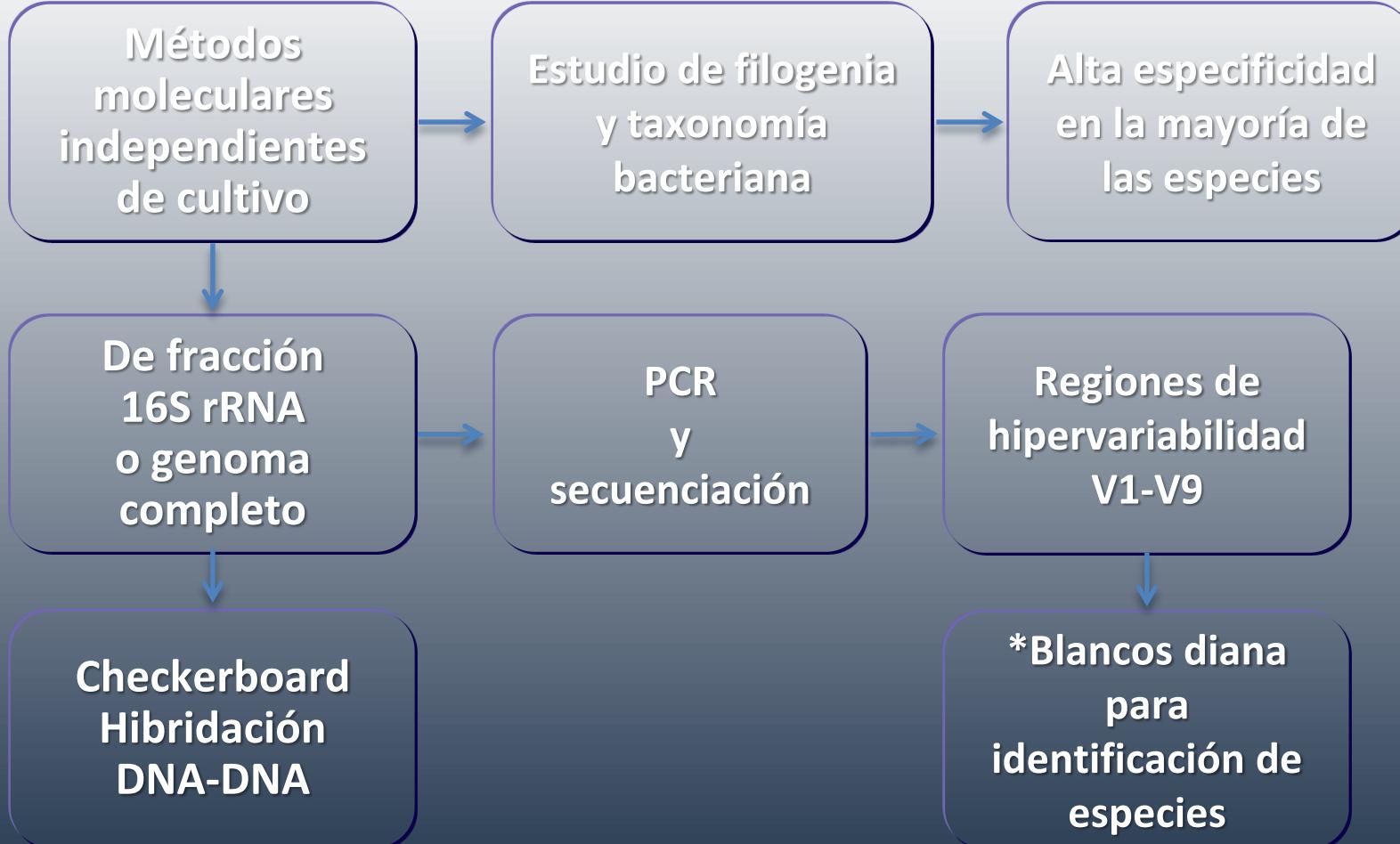
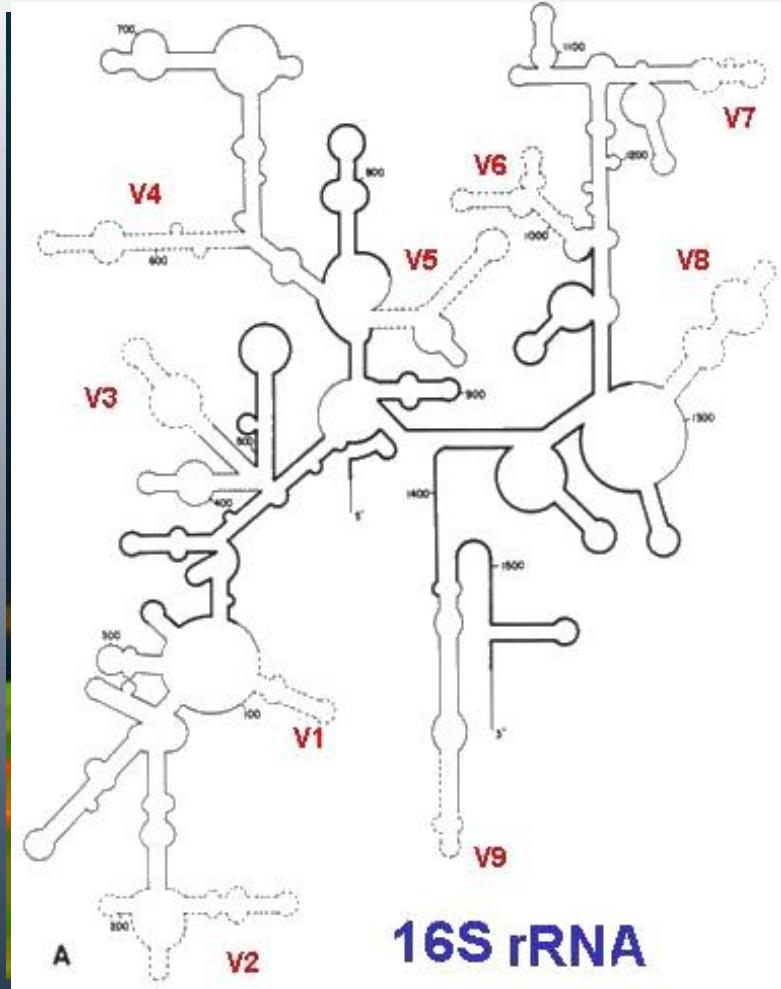
Técnicas de identificación genética



- **Hibridación in situ de fluorescencia (FISH).** Células marcadas con sondas fluorescentes para determinar la configuración espacial y morfología celular en comunidades complejas en un tejido (placa dentobacteriana).



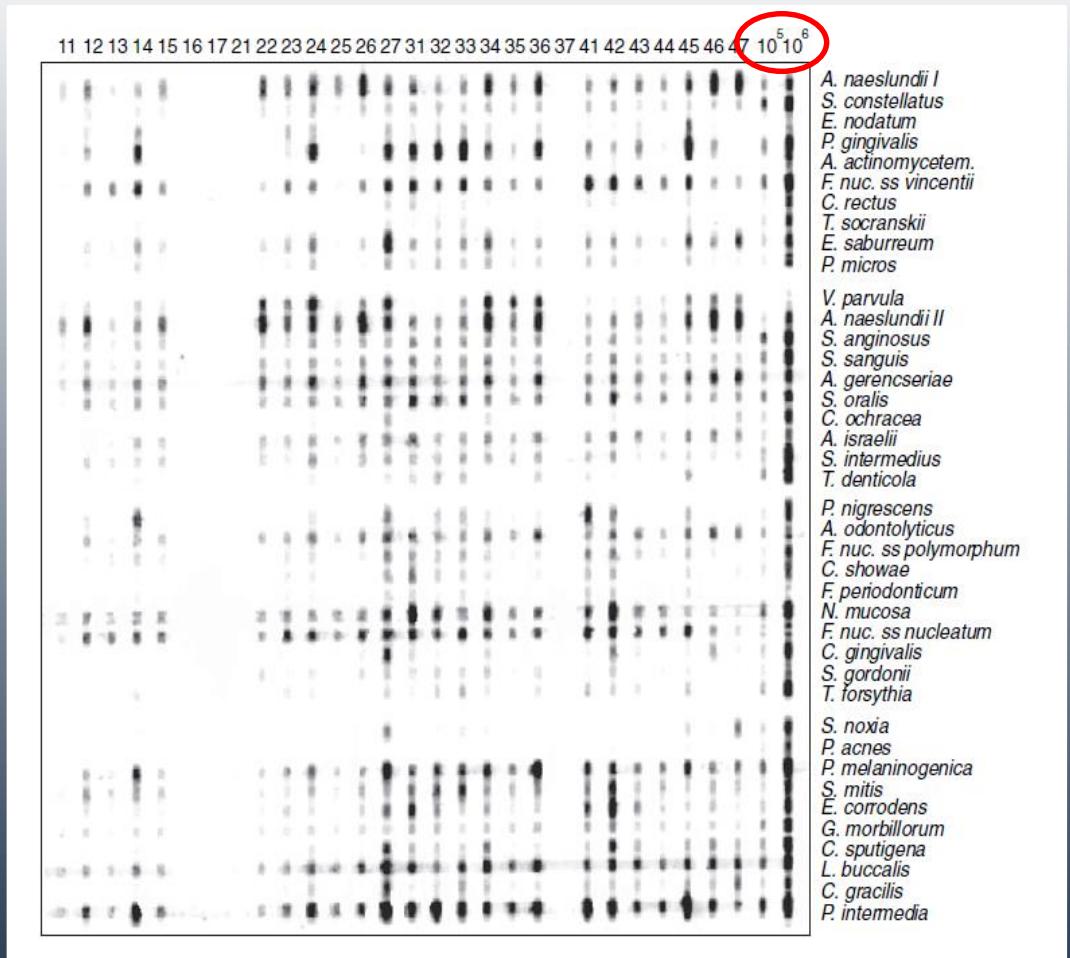
Técnicas de identificación genética



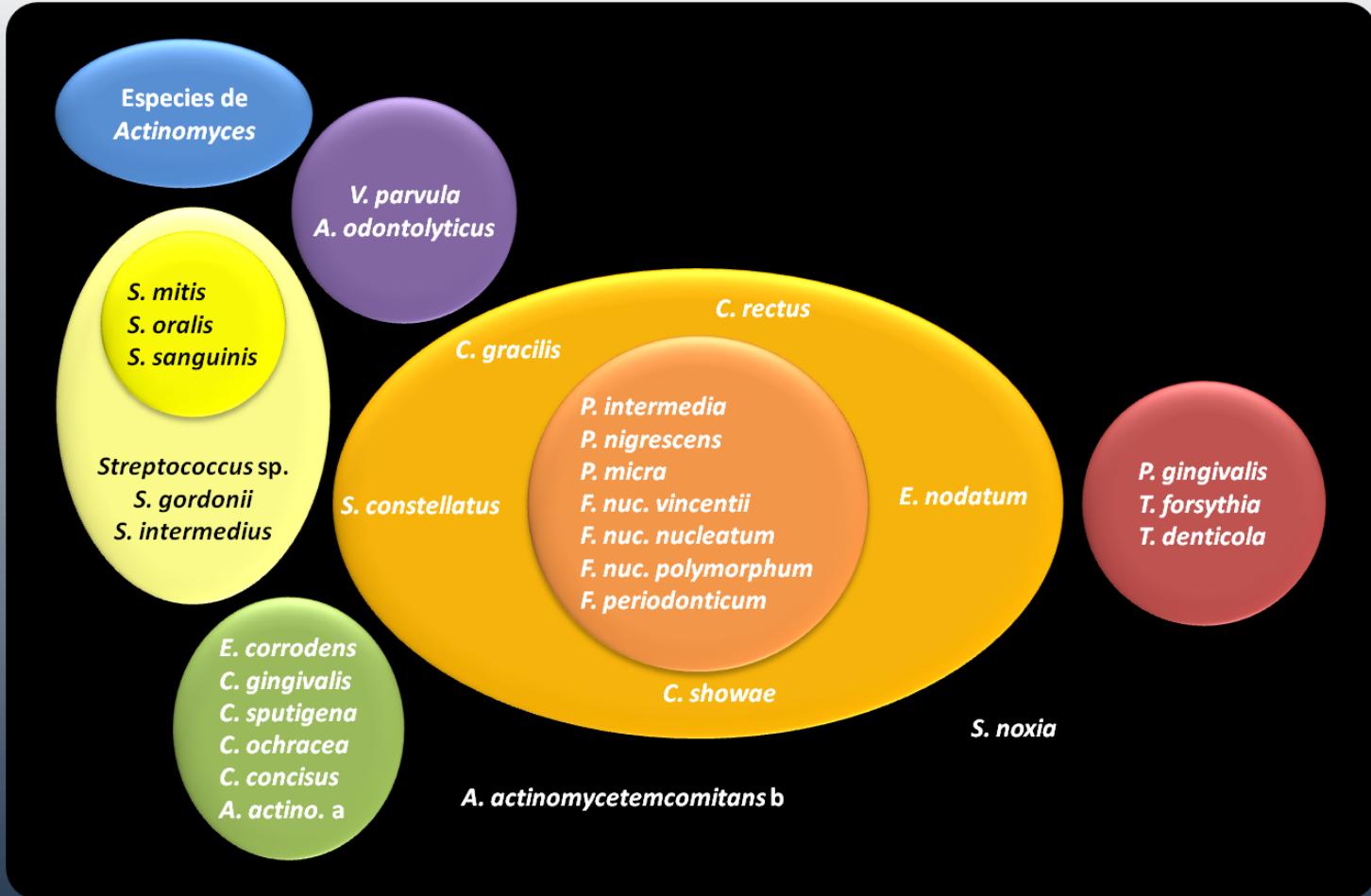
Hibridación DNA-DNA técnica de Chackerboard



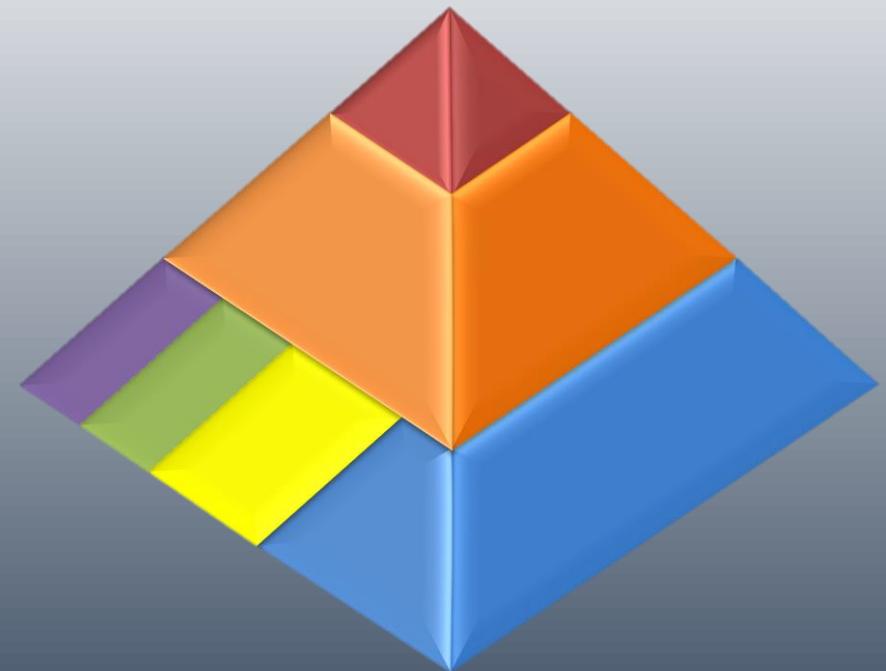
1. Análisis simultáneo de un gran número de muestras en un panel de 40 especies bacterianas
2. Permite semi-cuantificación gracias a sus estándares mixtos bacterianos (10^5 10^6 células)
3. Útil para describir perfiles microbianos y determinar el papel bacteriano en salud y enfermedad



Placa dentobacteriana subgingival y enfermedades periodontales



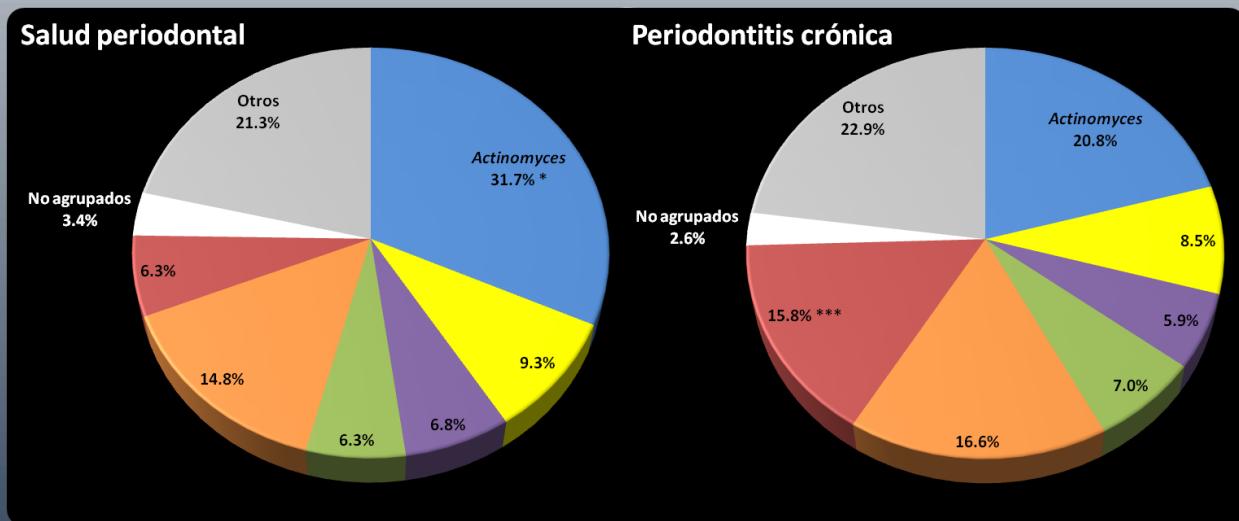
Equilibrio ecológico presente en Salud Periodontal



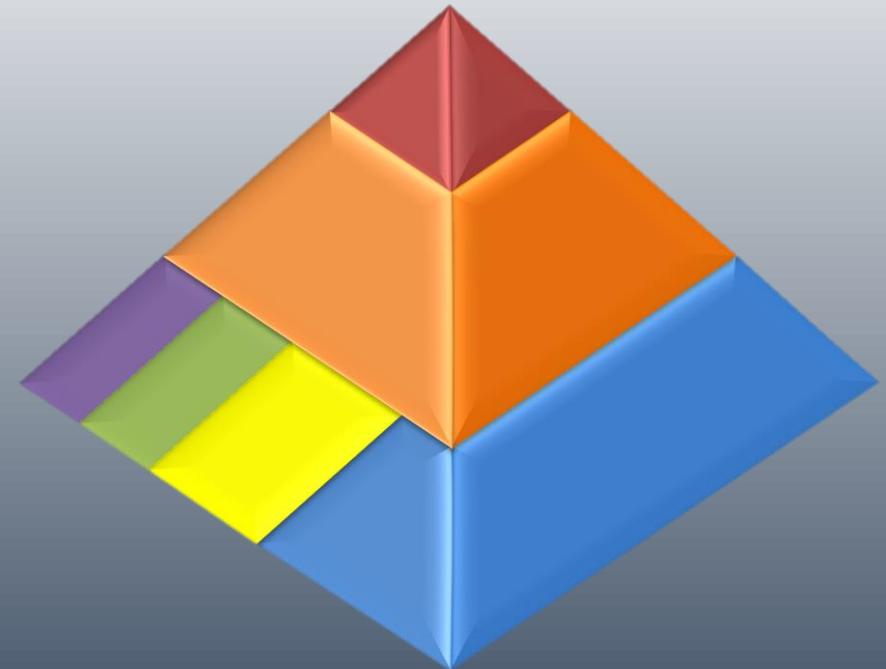
Enfermedades Periodontales
 > Patógenos y Patógenos putativos
 < Actinomyces

Placa dentobacteriana subgingival y enfermedades periodontales

Etiología de las enfermedades periodontales, estrechamente relacionada con infecciones endo-periodontales (microbiota específica en individuos sistémicamente sanos)



Equilibrio ecológico presente en Salud Periodontal

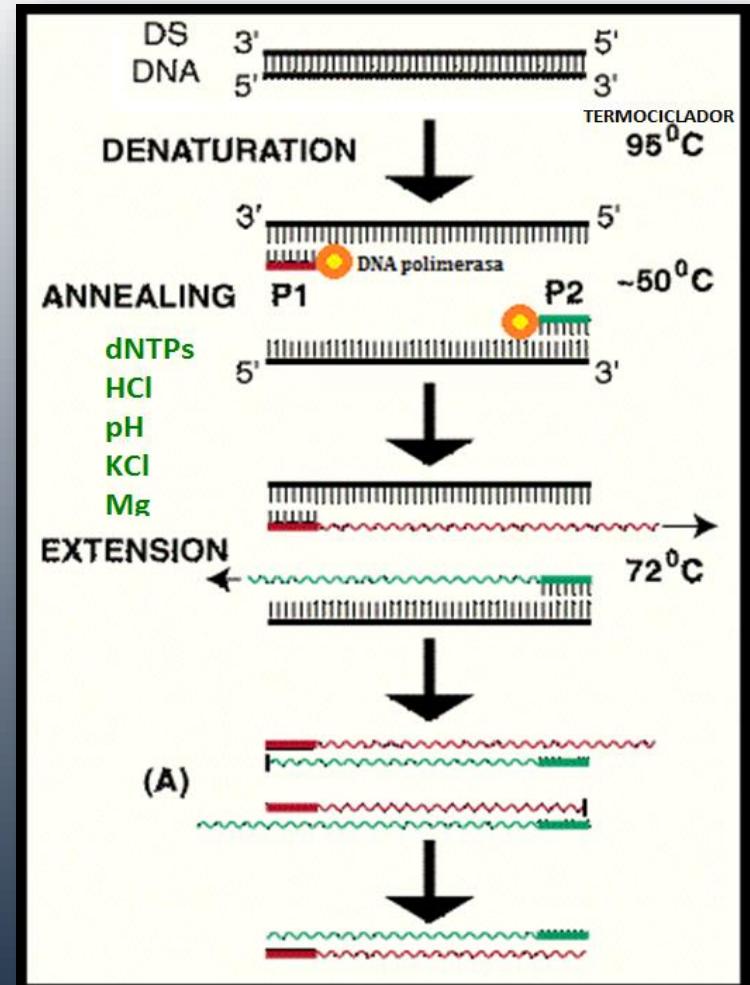
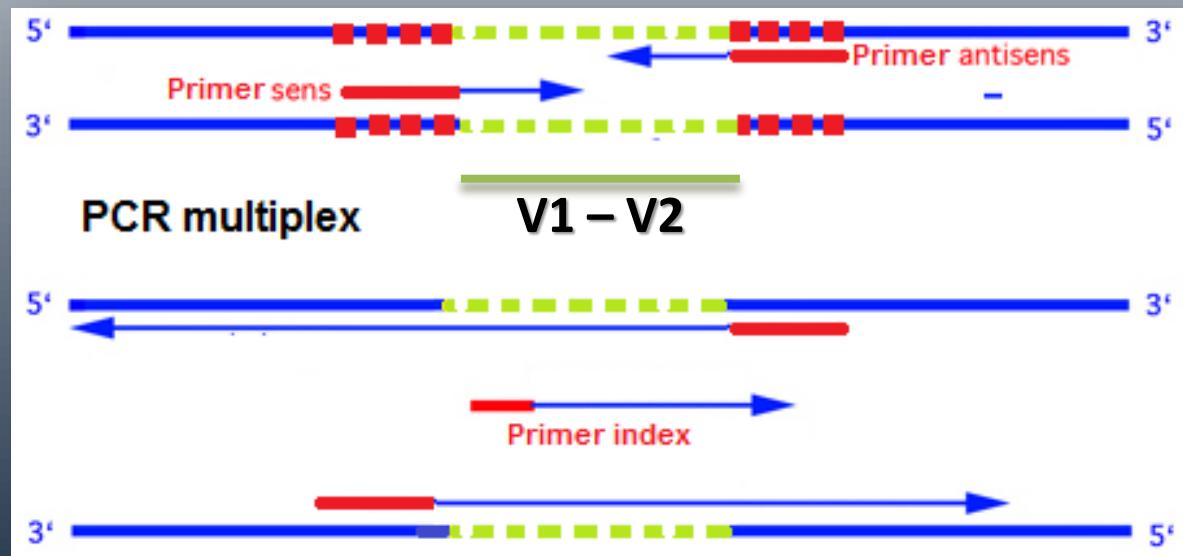


Enfermedades Periodontales
 > Patógenos y Patógenos putativos
 < Actinomyces

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)



1. Amplificación de una región/gen (16S rRNA) de interés a partir de un cultivo puro o una muestra clínica
2. Determinación de la composición y diversidad bacteriana



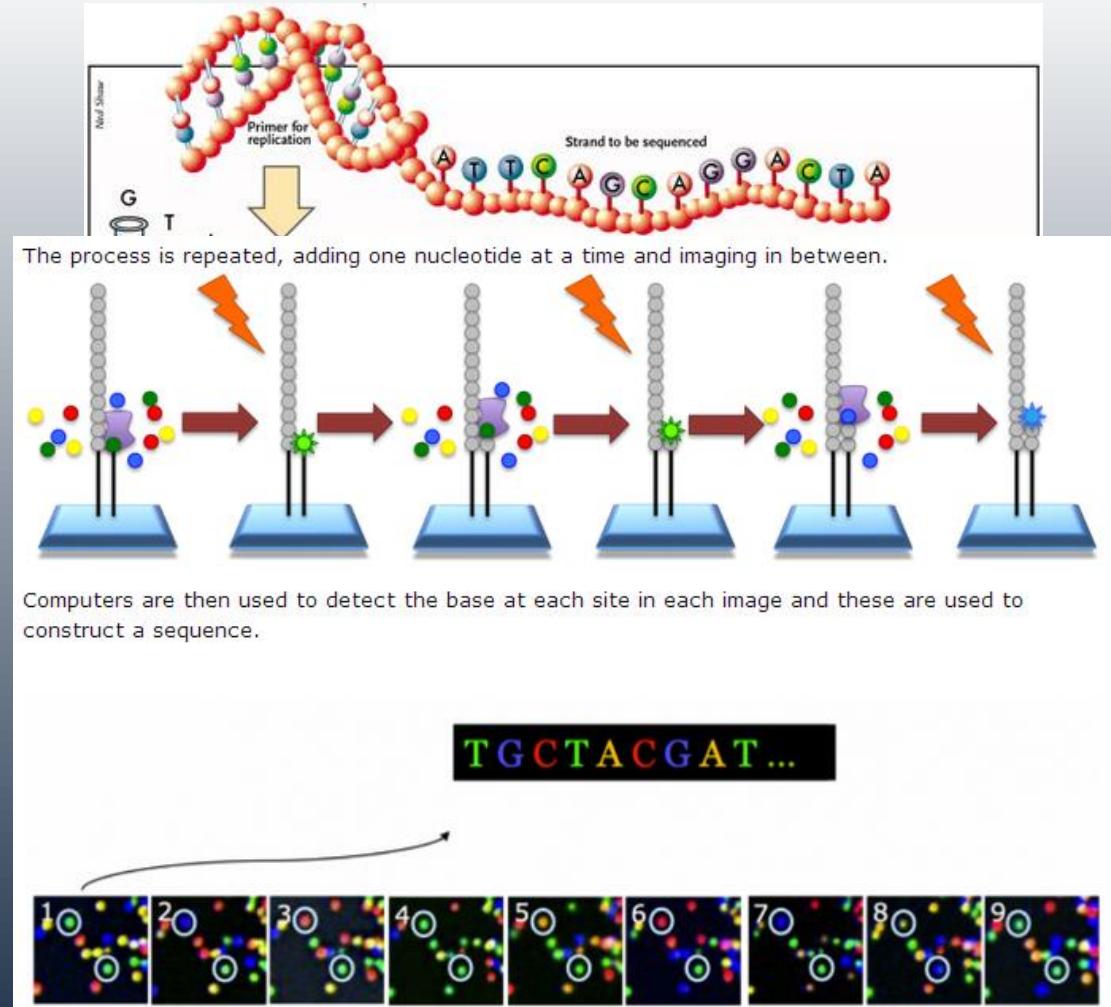
Secuenciación



- Determinación del orden preciso de los nucleótidos en una molécula de DNA o RNA
- Identificación de regiones específicas con previo PCR e identificación de nuevas especies bacterianas

Método de Sanger

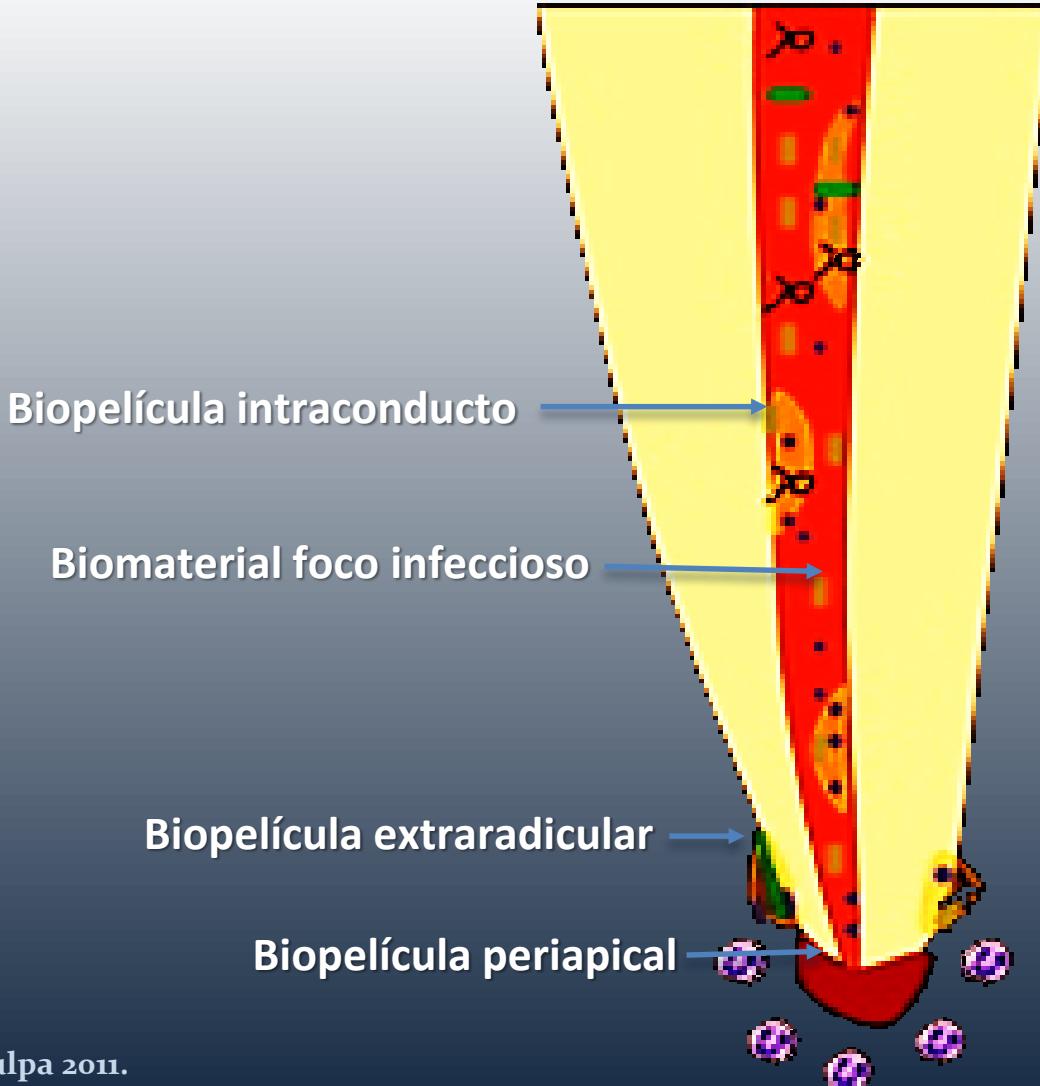
- Genera fragmentos de DNA de diferentes longitudes separados por electroforesis
- De nueva generación (NGS)
- Tecnología de mayor rendimiento para el análisis genómico microbiano



Etiología de las infecciones pulpares y periapicales



- Adhesión
 - Colonización
 - Invasión
 - Proliferación
 - Necrosis del tejido
 - Diseminación a periapice
 - Mediadores de la inflamación
 - Destrucción de los tejidos periapicales
- } Microbiana





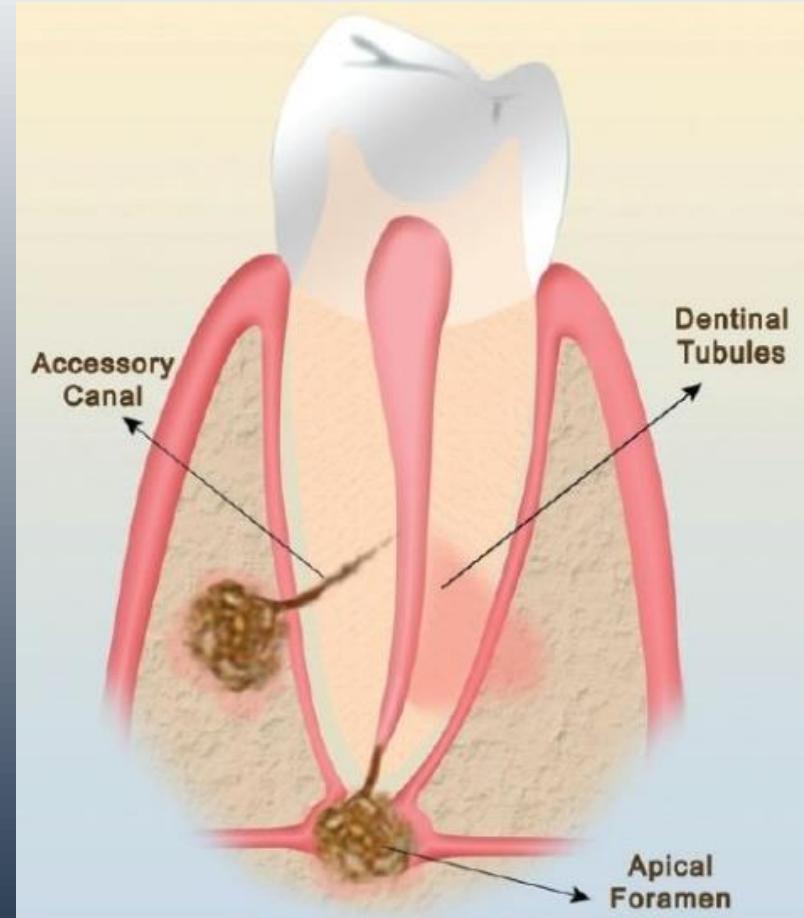
Microbiota de las infecciones pulpares y periapicales

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

Etiología de las infecciones endo - periodontales



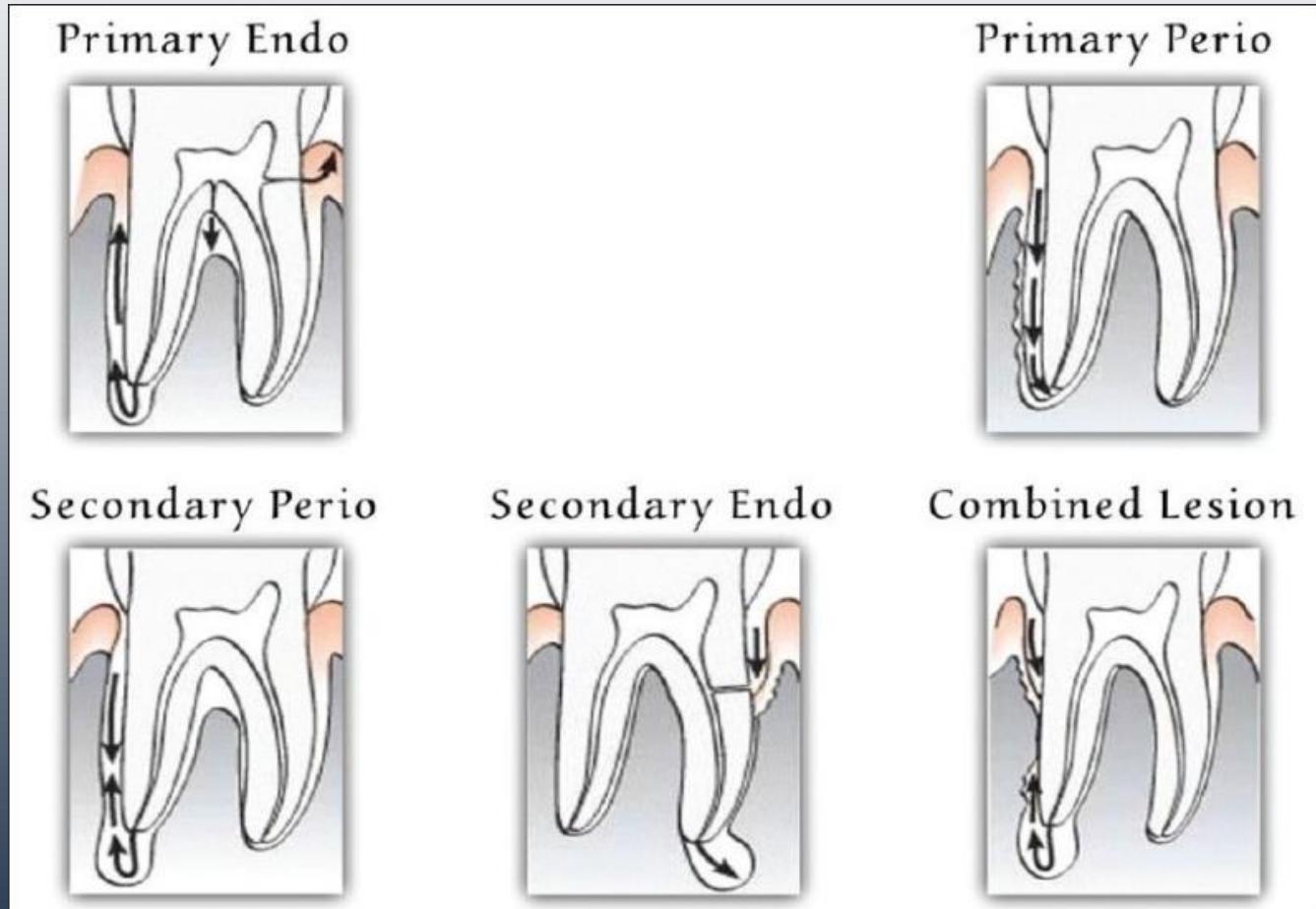
- Las infecciones pulparas y periodontales tienen relación por las conexiones anatómicas y vasculares existentes entre el periodonto y la pulpa como es a través de los forámenes apicales y de los conductos laterales



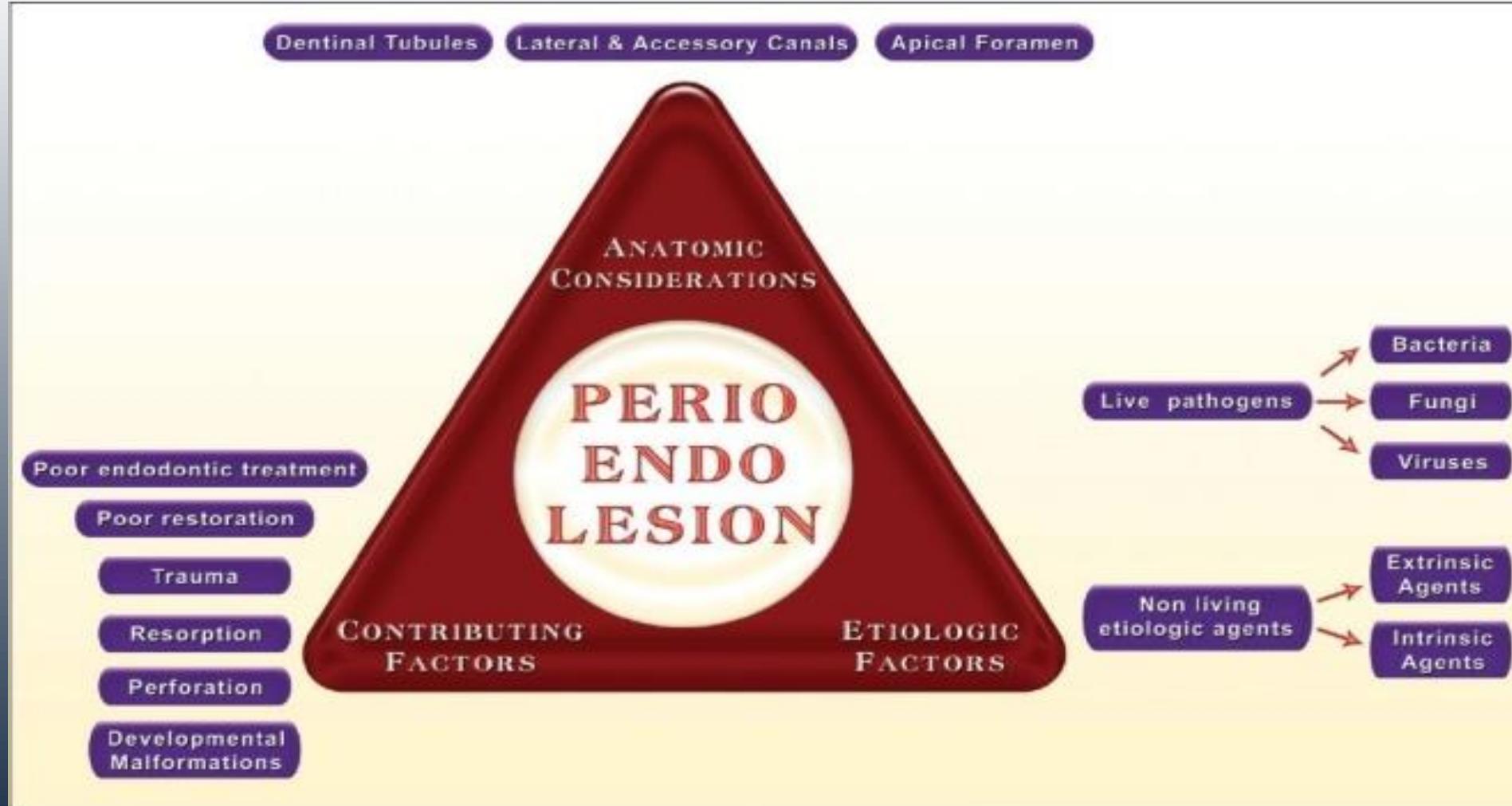
Etiología de las infecciones endo - periodontales



- Las infecciones pulparas y periodontales tienen relación por las conexiones anatómicas y vasculares existentes entre el periodonto y la pulpa como es a través de los forámenes apicales y de los conductos laterales
- Vías para el intercambio de agentes nocivos entre los dos compartimentos tisulares cuando uno o ambos tejidos están enfermos



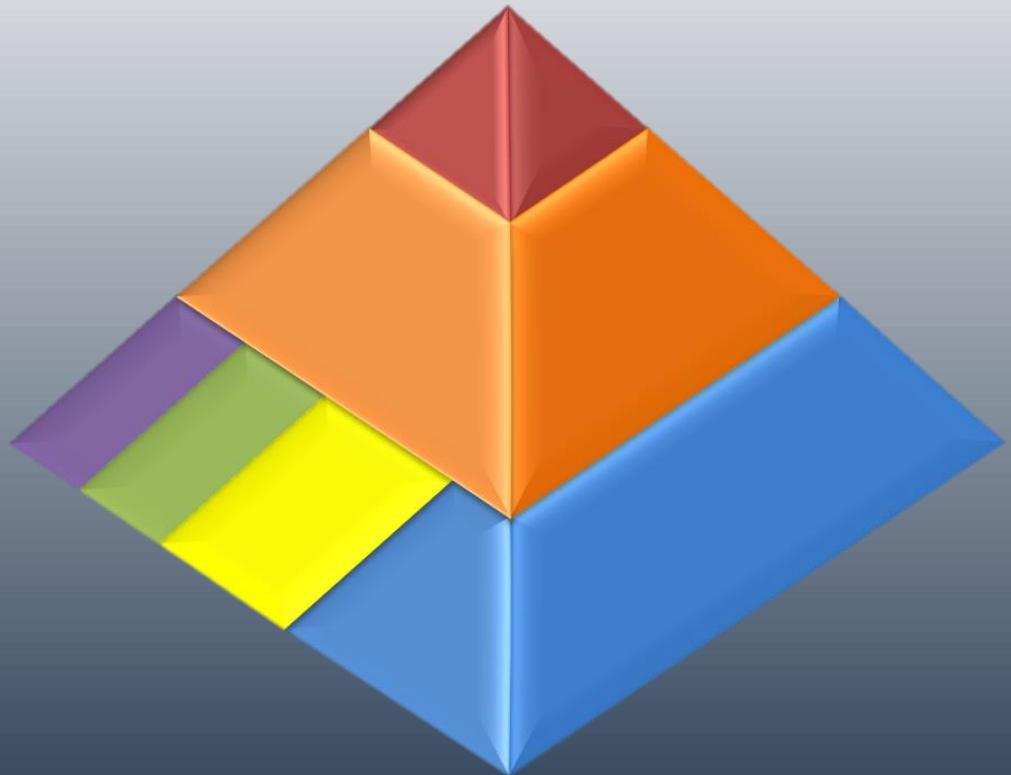
Etiología de las infecciones endo - periodontales



Microbiota de las infecciones endo - periodontales

Género	Conducto radicular (%)	Bolsa periodontal (%)
<i>Streptococcus</i>	2,65	26,10
<i>Peptococcus</i>	—	0,58
<i>Peptostreptococcus</i>	11,78	5,64
<i>Eubacterium</i>	13,82	7,79
<i>Propionibacterium</i>	5,40	0,21
<i>Actinomyces</i>	4,35	15,7
<i>Prevotella</i>	3,17	2,44
<i>Porphyromonas</i>	2,98	10,51

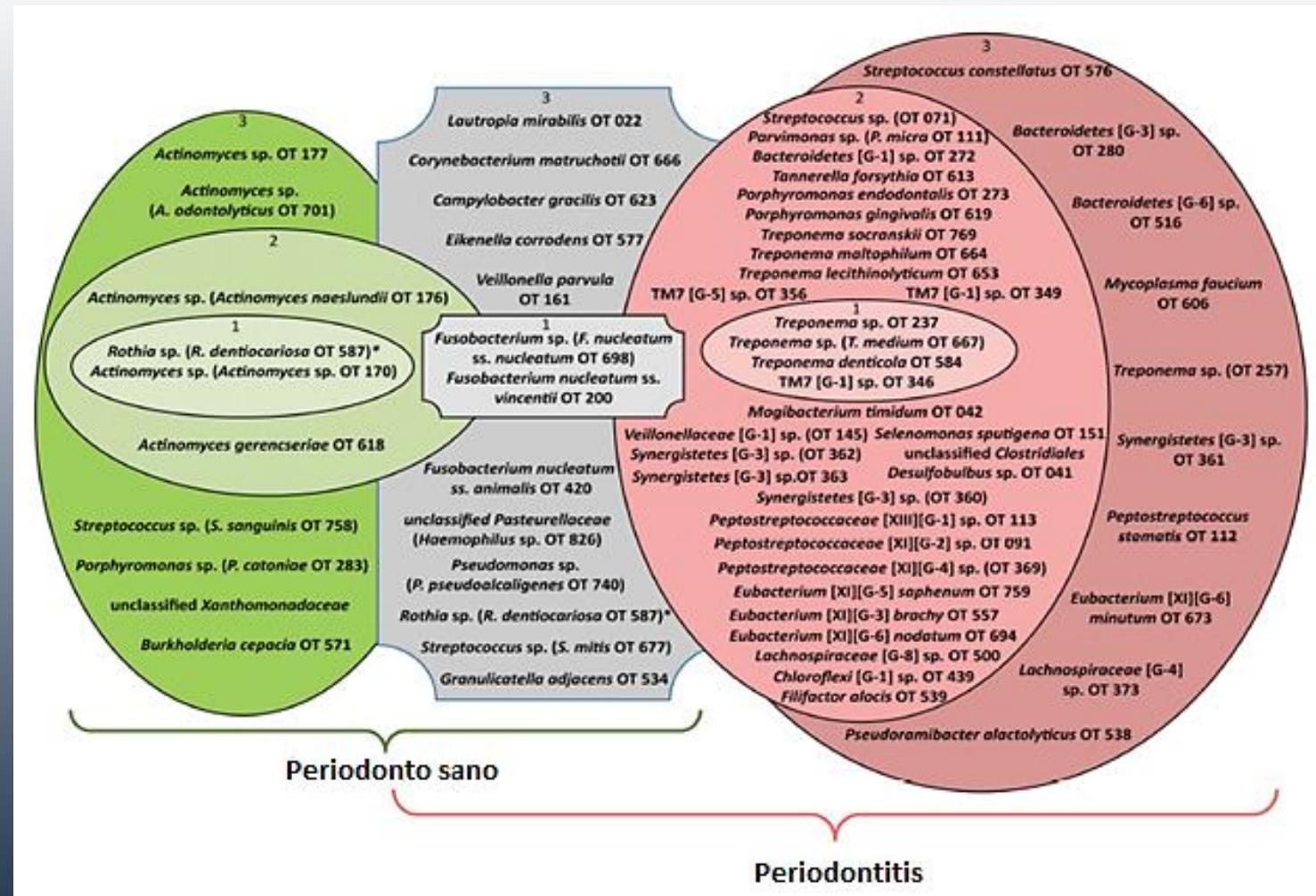
De Kobayashi y cols., 1990³.



Bacterias no cultivables de infecciones periapicales

Nuevas especies bacterianas

<i>Atopobium</i> genomosp. C1	<i>Synergistes</i> oral clone BH017
<i>Bacteroidetes</i> oral clone X083	<i>Synergistes</i> oral clone W028
<i>Desulfobulbus</i> oral clone R004	<i>Synergistes</i> oral clone W090
<i>Lachnospiraceae</i> MCE7_60	TM7 oral clone I025
<i>Synergistes</i> oral clone BA121	TM7 oral clone AH040



Microbiota en cavidades de dientes vitales con pulpitis



- 50% de *Streptococcus* del grupo viridans de estadios tempranos
- En las cámaras pulpares cerradas predominan anaerobios facultativos en un 70-80%, como son:

Veillonella parvula

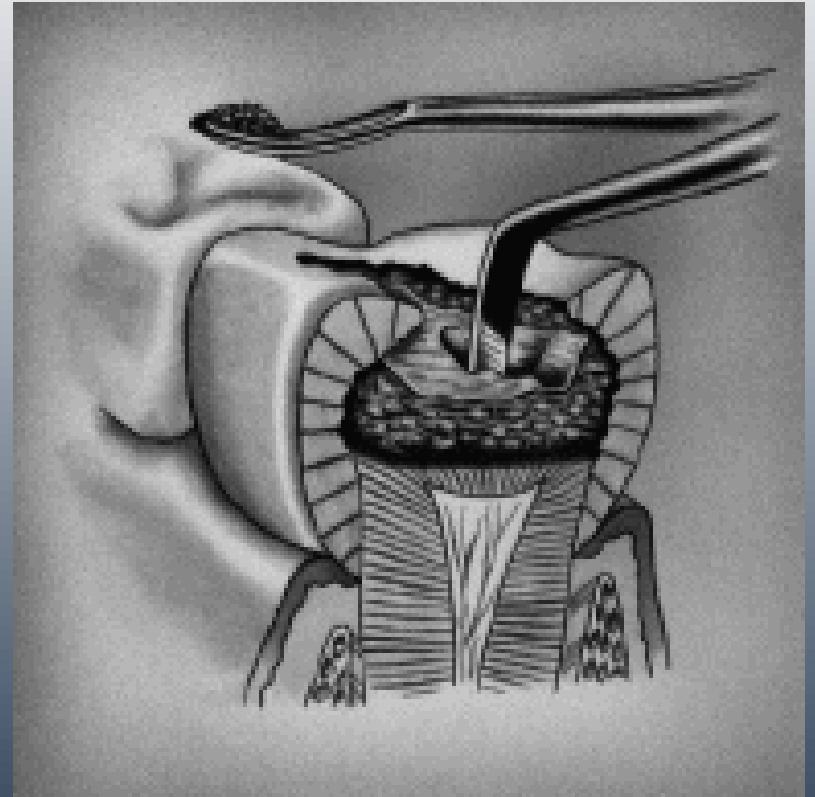
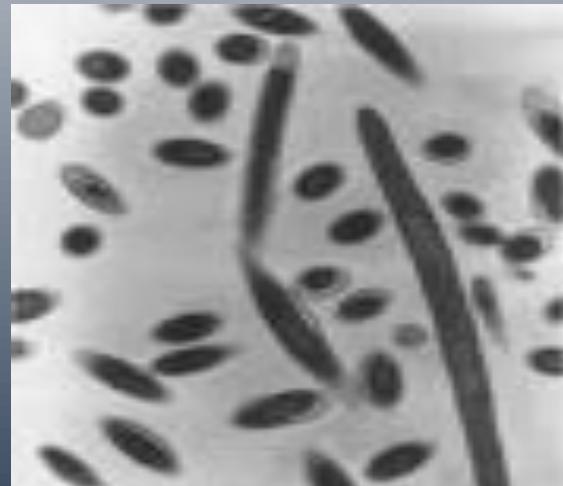
Eubacterium sp.

Prevotella sp.

Peptostreptococcus sp.

Fusobacterium sp.

Porphyromonas sp.



Microbiota en cavidades de dientes con necrosis pulpar



- Las necrosis pulpares son infecciones ocasionadas principalmente por aerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerofílicos
- Especies más comúnmente encontradas son:

Peptostreptococcus sp., *Fusobacterium* sp., *Prevotella* sp. *Porphyromonas* sp.,
Veillonella parvula, *Actinomyces* sp. y *Lactobacillus* sp.

- En el tercio apical se han localizado:

Camphylobacter rectus, *Eikenella corrodens* y *Capnocytophaga* sp.

Microbiota en cavidades de dientes con necrosis pulpar



Frequency of detection of novel species/phylotypes in primary or persistent endodontic infections as revealed by 16S rRNA gene-based nested or heminested PCR

Species or clone(s)	Primary endodontic infections (no. of untreated teeth) ^a	Persistent endodontic infections (no. of root-filled teeth) ^a
<i>Dialister invisus</i>	17/21 (81)	3/22 (14)
<i>Synergistes</i> oral clone BA121	7/21 (33)	1/22 (4.5)
<i>Olsenella uli</i>	7/21 (33)	1/22 (4.5)
<i>Synergistes</i> oral clones BH017/D084	6/21 (29)	0/22 (0)
<i>Synergistes</i> oral clone W090	5/21 (24)	0/22 (0)
<i>Actinobaculum</i> oral clone EL030	3/21 (14)	0/22 (0)
<i>Desulfobulbus</i> oral clone R004	3/21 (14)	0/22 (0)
TM7 oral clone I025	2/21 (9.5)	0/22 (0)
<i>Olsenella profusa</i>	2/21 (9.5)	0/22 (0)
<i>Prevotella pallens</i>	2/21 (9.5)	0/22 (0)
<i>Atopobium parvulum</i>	1/21 (5)	0/22 (0)
<i>Synergistes</i> oral clone E3_33	1/21 (5)	0/22 (0)

Microbiota en cavidades de abscesos periapicales



- Evolución en horas, con dolor muy intenso, tumefacción periapical y/o celulitis
- Presencia de *Treponema denticola* en conductos con abscesos periapicales *Tannerella forsythia* asociado con dolor
- Especies comúnmente encontradas son:

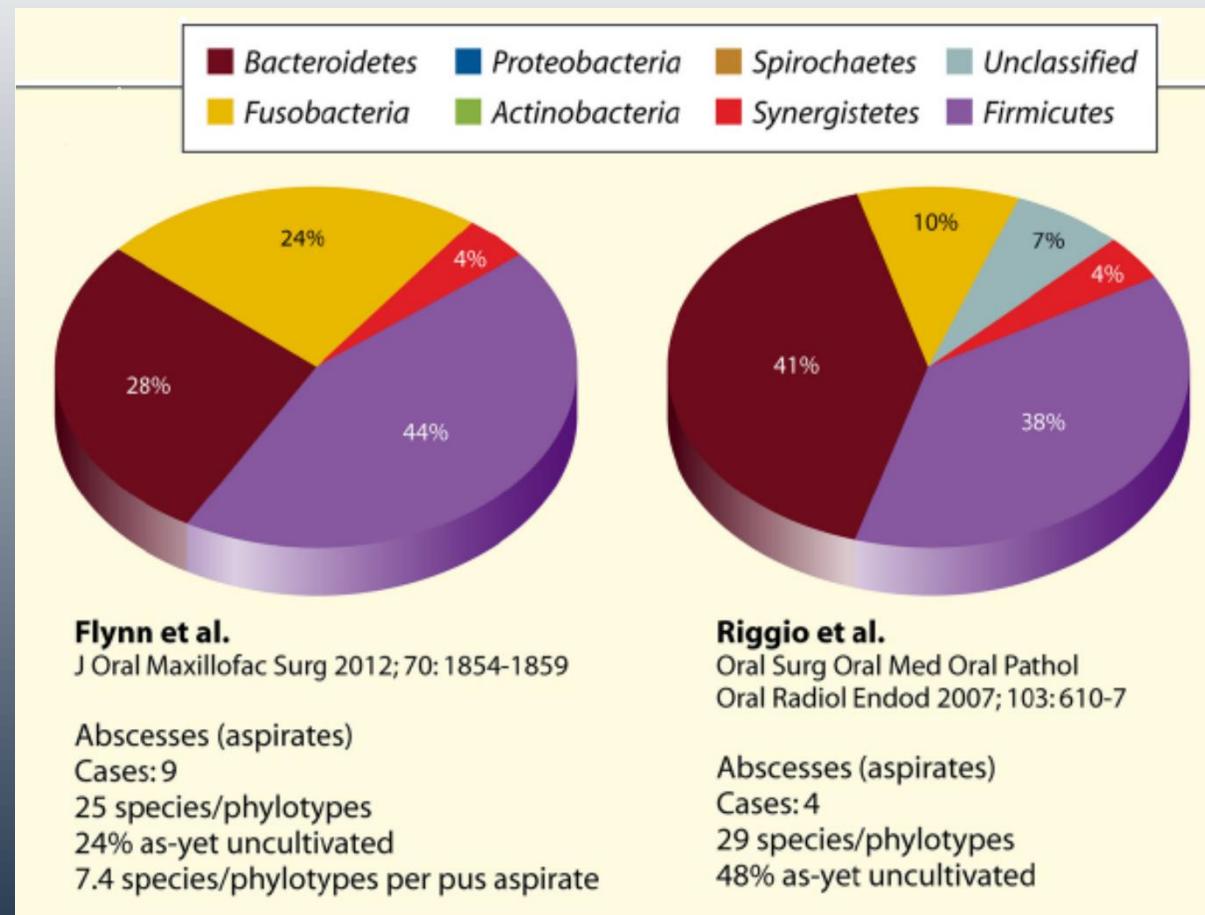
Fusobacterium nucleatum subs. *vincentii*

Veillonella parvula

Treponema socranskii

Enterococcus faecalis

Campylobacter gracilis



Microbiota en fracasos endodóncicos



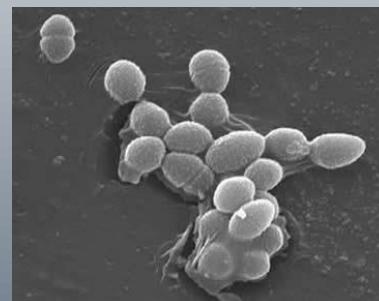
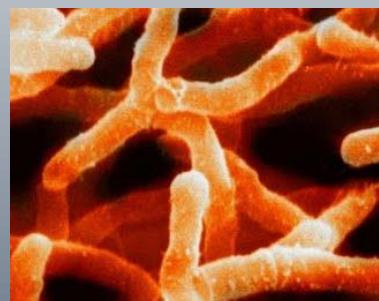
- La causa de la mayoría de los fracasos endodónticos se dan por la desinfección incompleta del conducto radicular ó por la persistencia de infecciones preexistentes

- Las especies bacterianas aisladas:

Actinomyces israelii

Enterococcus faecalis

Peptostreptococcus propionicus



- *E. faecalis* y *C. albicans* toleran un pH cercano a 12 por su resistencia a la alcalinidad (medicación con hidróxido de calcio)

Otros microorganismos relacionados con infecciones endo - periodontales

Hongos	Virus	Arqueas
<i>Candida albicans</i>	Citomegalovirus humano (CMVH)	<i>Methanobrevibacter oralis</i>
<i>Candida glabrata</i>	Virus de Epstein-Barr (VEB)	
<i>Candida guilliermondii</i>		
<i>Candida parapsilosis</i>		
<i>Candida tropicalis</i>		
<i>Geotrichum candidum</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		



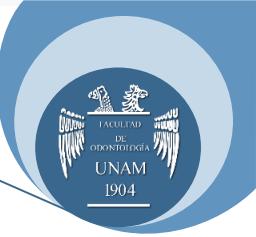


- Existe una gran diversidad bacteriana en la cavidad oral 707 Taxa de las cuales entre el 35-50% son especies no cultivables, la literatura sugiere que este segmento alberga tanto especies patógenas como benéficas.
- Especies bacterianas cultivables y no cultivables, se encuentran implicadas en el equilibrio de salud oral, así como en infecciones intraorales como son las endo – pulparas.
- El mayor avance en diagnóstico de enfermedades infecciosas, así como del papel que juegan las bacterias comensales, depende en gran medida del avance de la tecnología, sin dejar a un lado las técnicas microbiológicas tradicionales como son microscopía y métodos de cultivo.



- El agente etiológico de las lesiones endo – pulpar, son los microorganismos propios de la placa dentobacteriana (flora endógena), dependiendo del sitio dónde inició la infección.
- Los microorganismos presentes pueden encontrarse en forma de biopelícula intraconducto, extraradicular, periapical, o como biomaterial del foco infeccioso, y de ello va a depender la respuesta inmunológica del huésped y por consiguiente la evolución de la infección.
- A pesar de la aplicación de técnicas moleculares en la identificación de la microbiota en los distintos tipos de infección pulpar, no existen perfiles microbiológicos muy bien definidos para cada una de las clasificaciones, particularmente necrosis pulpar y sus derivadas.

Conclusión



- La implementación de técnicas moleculares para identificar un mayor número de especies del microbioma oral humano, deben ser con la finalidad de llegar a la identificación de perfiles microbiológicos que permitan un mejor entendimiento del las infecciones endógenas mixtas como son las endo – pulpares.



Por su atención ¡Gracias!

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR

División de Estudios de Posgrado e Investigación • Facultad de Odontología • Universidad Nacional Autónoma de México

