

# Identificación molecular de *Fusobacterium nucleatum* en conductos radiculares necróticos de dientes con periodontitis apical crónica.

Alvarado-Cárdenas G<sup>1</sup>, Hernández-Solís SE<sup>2</sup>, Rueda-Gordillo F<sup>2</sup>, Aguilar-Orozco N<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Clínica de la Especialidad en Endodoncia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán <sup>3</sup>Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Nayarit.

## RESUMEN

La periodontitis apical crónica es una enfermedad inflamatoria que afecta a los tejidos que rodean la parte apical de la raíz dental y es causada principalmente por microorganismos que se encuentran infectando el conducto radicular. *Fusobacterium nucleatum* es uno de los microorganismos más frecuentemente identificado en los conductos radiculares con necrosis pulpar y su presencia se ha asociado a síntomas preoperatorios y al aumento de la patogenicidad de otros microorganismos. El objetivo de este estudio fue identificar *F. nucleatum* en conductos radiculares con necrosis pulpar de dientes con periodontitis apical crónica mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En total se estudiaron 92 muestras obtenidas de un grupo de pacientes del Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, de las cuales en 83 fue posible aislar el DNA, de ésta, en 4 fue posible identificar a *F. nucleatum* lo que correspondió a una prevalencia del 4.81%. Es importante continuar realizando estudios de este tipo que contribuyan a establecer la epidemiología de microorganismos endodónticos nuestro país.

**Palabras clave:** Periodontitis apical, *Fusobacterium nucleatum*, conducto radicular, PCR.

## ABSTRACT

Chronic apical periodontitis is an inflammatory disease that affects the tissues surrounding the apical part of the tooth root and is mainly caused by microorganisms that are infecting the root canal. *Fusobacterium nucleatum* is one of the most frequently identified microorganisms in root canals with necrotic pulp and their presence has been associated with preoperative symptoms and the pathogenicity increased other microorganisms. The aim of this study was to identify *F. nucleatum* in root canals with necrotic pulp of teeth with chronic apical periodontitis using the technique of the Polymerase Chain Reaction (PCR). In total 92 samples were studied by a group of patients in the Graduate Endodontics, Faculty of Dentistry, Autonomous University of Yucatan, in 83 samples it was possible to isolate the DNA, of these, in 4 it was possible to identify *F. nucleatum* which corresponded to a prevalence of 4.81%. It is important to continue such studies to establish the epidemiology of microorganisms endodontic in our country.

**Key words:** Apical periodontitis, *Fusobacterium nucleatum*, root canal, PCR.

Solicitud de sobretiros: Gabriel Alvarado Cárdenas

Correo electrónico: g.alvarado@uady.mx, gabrichac74@hotmail.com

Correspondencia: Calle 61 A #492A x Av. Itzáes, col. Centro, Mérida, Yucatán, México C.P. 97000.

Recibido: Enero 2011/ Aceptado: Mayo 2011

Artículo disponible en <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V03N1p7.pdf>

## INTRODUCCIÓN

La Endodoncia es la especialidad odontológica que se encarga de la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la pulpa dental y de los tejidos circundantes afectados por la misma. El principal objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar los microorganismos del sistema de conductos radiculares y prevenir la infección o reinfección de la pulpa, tanto en conductos radiculares como en los tejidos periapicales (1).

La Periodontitis apical crónica es una enfermedad inflamatoria que afecta a los tejidos que rodean la parte apical de la raíz dental y es causada principalmente por bacterias que se encuentran infectando el conducto radicular (2). Es de origen polimicrobiano y mixto, de tal manera que incluyen anaerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerófilos (1). Bacterias pertenecientes a los géneros *Porphyromona*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium* han sido frecuentemente asociadas a este tipo de infecciones (3) y son consideradas como potencialmente patógenas ya que en este sitio, factores de virulencia como la actividad proteolítica, producción de endotoxinas, capacidad para inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis, pueden tener acceso a los tejidos periradulares (4). *Fusobacterium nucleatum*, es un bacilo anaerobio estricto, Gram negativo, no formador de esporas, que habitualmente se presenta en la cavidad bucal (5) que frecuentemente ha sido aislado en conductos radiculares con necrosis pulpar (3) e infecciones endodónticas sintomáticas (6). También se ha observado que su presencia influye en el incremento de la patogenicidad de otras bacterias como *P. gingivalis* y *P. intermedia* (3).

Los microorganismos de origen endodóntico son imposibles o difíciles de cultivar por métodos microbiológicos, por lo que, durante las últimas décadas se han empleado métodos de genética molecular para su identificación. Estos métodos se basan en el análisis del RNAr 16S (DNAr 16S) (7), molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (8). La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un método de

diagnóstico molecular basado en la detección del gen RNAr 16S de los principales patógenos endodónticos y su empleo representa una ventaja tanto en tiempo como en precisión, lo cual ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos especialmente en la cavidad oral facilitado la tipificación de más especies relacionadas a la infección endodóntica lo que ha permitido obtener conocimientos significativos acerca de la microbiota de conductos radiculares infectados (9). Estudios realizados por Siqueira, en conductos radiculares infectados, han reportado una prevalencia de *F. nucleatum* del 26% (2) y del 10.5% (10) en dientes con periodontitis apical crónica, en tanto que Fouad, en conductos radiculares infectados con pulpa necrótica, reportó una prevalencia del 82% (3). Un estudio realizado por Baumgartner reportó una prevalencia del 73% en Estados Unidos, mientras que en Brasil dicha prevalencia fue del 4%, concluyendo esta diferencia en las prevalencias podrían deberse a la influencia geográfica en la composición de la microbiota del conducto radicular (11).

A pesar de que la periodontitis apical crónica es una de las patologías periapicales más frecuentes, en México no se tienen datos que reporten la prevalencia de *F. nucleatum* en este tipo de infecciones, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar *F. nucleatum* en conductos radiculares con necrosis pulpar de dientes con periodontitis apical crónica mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), lo cual contribuirá a establecer la epidemiología de este microorganismo en nuestro país.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron noventa y dos pacientes órganos dentarios con periodontitis apical crónica con necrosis pulpar, provenientes de igual número de pacientes que acudieron para su atención al Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la UADY de mayo de 2009 a marzo de 2010.

### Toma de muestra

1. Se administró la técnica de anestesia necesaria y se aisló el diente con dique de hule.

2. Se colocó material de obturación provisional provisita para evitar la filtración de saliva a través del dique al área de trabajo.
3. Para el área de trabajo se desinfectó el dique, la grapa y la corona del diente con peróxido de hidrógeno al 30% y tintura de yodo al 5%, posterior a esto se limpió con hipoclorito de sodio al 5.25%.
4. Se ingresó a la cámara pulpar con fresas de alta velocidad de fisura no. 701 estériles, sin empleo de refrigerante.
5. Se determinó la longitud de trabajo con un localizador electrónico apical y se comprobó radiográficamente que esta fuera la correcta.
6. Se instrumentó sin utilizar alguna solución irrigadora, a longitud de trabajo hasta una lima manual número 25 tipo K.
7. Si el conducto se encontró seco, se depositó solución salina estéril para evitar la contaminación proveniente de la cámara pulpar.
8. Las muestras se obtuvieron colocando 3 puntas de papel estéril No. 20 durante 1 minuto cada una en el interior del conducto (en el más amplio, en caso de ser multirradicular) para absorber el contenido del mismo. Posteriormente, las puntas de papel se colocaron en un vial estéril con 1ml de buffer TE 1X (Tris HCl 10mM y EDTA 1mM) pH 8. Los viales se congelarán a -70°C hasta el momento de la extracción del DNA (3).

#### Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante la técnica de calentamiento-congelamiento. El vial con las puntas de papel se descongeló a temperatura ambiente, y la muestra se resuspendió en el buffer TE agitando en el vórtex durante un minuto. Para el lavado de la muestra, la suspensión microbiana se transfirió a un tubo de ependorff y se centrifugó a 2500g durante 5 minutos. Enseguida el precipitado se resuspendió en 200µL de agua destilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones, este paso se realizó tres veces. Después del último lavado, el precipitado se resuspendió en 200µL de agua destilada estéril y se calentó a 95°C por diez minutos e inmediatamente después se congeló por a -80°C por cinco minutos. Al cabo de este tiempo, el vial se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000 g a 4°C durante 3 minutos; para remover los desechos celulares así como las células que no se hayan roto. Se recolectó el sobrenadante y se le midió la cantidad de DNA extraído por

espectrofotometría para posteriormente ser usado como templado para la amplificación por PCR (2).

#### Identificación por el método de PCR

Se usaron los oligonucleótidos específicos para *F. nucleatum* FN 5047-1 (CAA ATGCTTGTGTCATAACT) y FN 5047-2 (TTAGAAATGGT AGAATAAT) los cuales amplifican una secuencia de DNA de 500pb. La mezcla de reacción se preparó a un volumen total de 25 µl: 2.5 µl de buffer PCR 10X, 1 µl de cada oligonucleótido (0.4 µM), 0.5 µl de dNTPs (0.2 µM), 0.1 µl de Taq DNA polimerasa (0.5 µM), 1 µl del templado de DNA (10ng) y 18.9 µl de agua inyectable.

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: Calentamiento a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 72°C durante 5 minutos (12). En cada amplificación se incluyó como control positivo la cepa de referencia de *F. nucleatum* ATCC 25586 y uno negativo que no contenía el templado de DNA.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras amplificadas se colocaron en un gel de agarosa al 1% en Buffer TBE 1X (Tris-EDTA-Borato de sodio) y corrió a un voltaje constante de 70 volts durante 2.5 horas (12). En cada gel se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. Al cabo de este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó con la ayuda de una lámpara de luz UV.

#### RESULTADOS

Se estudiaron un total de 92 muestras obtenidas de conductos radiculares con periodontitis apical crónica. Del total de muestras estudiadas, en 9 no fue posible extraer el DNA, esto probablemente se haya debido a que la muestra tomada de los conductos radiculares no fue suficiente o al tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el traslado al laboratorio para su congelamiento a -70°C, lo que tal vez pudo ocasionar que el DNA se degradara. De las 83 muestras en donde si fue posible aislar el DNA, en 4 se observaron amplificadas correspondientes a los oligonucleótidos específicos de *F. nucleatum*, lo que correspondió a una prevalencia del 4.81%.

## DISCUSIÓN

La periodontitis apical crónica es una de las enfermedades más comunes de etiología bacteriana, diversos estudios han reportado la presencia de *F. nucleatum* en conductos radiculares con necrosis pulpar. Los métodos de biología molecular como la PCR han contribuido al estudio de la microflora endodóntica ya que esta técnica resulta ser lo suficientemente sensible como para detectar pequeñas cantidades de DNA de los microorganismos presentes en este tipo de infecciones.

Rocas ha reportado prevalencias de *F. nucleatum* del 44% (13) y 53% (14) en conductos radiculares de órganos dentales con periodontitis apical crónica, Gomes del 11.5% en conductos radiculares necróticos (15), Siqueira en conductos radiculares infectados reportó una prevalencia del 26% (2) y 10.5% en periodontitis apical crónica (10). En este estudio la prevalencia encontrada fue de 4.81%. Si bien las diferencias en las prevalencias reportadas en los diferentes estudios pudieran deberse a la sensibilidad y especificidad de los métodos de identificación empleados, también ha mencionado que ubicación geográfica pudiera tener alguna influencia sobre estos resultados.

## CONCLUSIONES

Esta investigación, constituye el primer reporte en México de *F. nucleatum* mediante una técnica molecular como la PCR. Es importante que se lleven a cabo estudios de este tipo, utilizando el mismo protocolo de identificación, para establecer con más precisión la epidemiología de *F. nucleatum* en México.

## REFERENCIAS

1. Silva BL, Nelson FP, Faria G, Souza SM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J* 2006;17(2):144-48.
2. Siqueira JF, Rocas IN, Alves F, Santos K. Selected Endodontic Pathogens in the Apical Third of Infected Root Canals: A Molecular Investigation. *J Endod* 2004, 30(9):638-43.
3. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-Based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3223-31.
4. Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Silva B, Hamdan J, Nicoli J, Carvalho M, Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16 (2):100-5.
5. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989;15(1):13-19.
6. Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Silva B, Hamdan J, Nicoli J, Carvalho M, Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16 (2):100-5.
7. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders P, Mackenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular Identification of Microorganisms from Endodontic Infections. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3282-89.
8. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:1-10.
9. Guilarte C, Pardi G, Céspedes C. Cambios taxonómicos en el grupo de bacilos gran negativos de interés en Odontología. *Acta Odontol Venez* 2005; 43(3):327-31.
10. Siqueira JF, Rocas IN, Alves F, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2009; 107(5):721-26.
11. Baumgartner JC, Siqueira J, Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *Journal of endodontics*. 2004; 30(3):141-44.
12. Avila-Campos M.J. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. *Braz J Microbiol* 2003;34:81-4.
13. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (11):3599-3606.
14. Rocas IN, Alves FRF, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF Jr. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36(10):1617-21.
15. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(2):71-6.