

## Identificación mediante PCR de *Candida albicans* aisladas de conductos radiculares necróticos

Romero-Salazar DB, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular, <sup>2</sup>Especialidad de Endodoncia  
Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán

### RESUMEN

Se han reconocido a los microorganismos como los principales causantes de enfermedades pulpares y periapicales. Hasta el momento, los más estudiados han sido las bacterias. Sin embargo, algunos estudios reportan la presencia de levaduras dentro de los conductos radiculares infectados y los causantes de fallos en los tratamientos. El objetivo de este estudio fue determinar mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de *Candida albicans* en conductos radiculares infectados. Se utilizaron primers de *C. albicans* específicos para el gen 25sRNA en 77 muestras provenientes de conductos radiculares con pulpas necróticas con o sin lesión periapical. La frecuencia de *Candida albicans* encontrada fue del 2.6% de total de los pacientes, mismas que correspondieron al grupo con pulpas necróticas con lesión periapical 8.3% (2 de 24). Los resultados indican que la PCR es un método molecular extremadamente sensible para la identificación de *C. albicans*, y que este microorganismo, podría estar involucrado en necrosis pulpares con lesión periapical.

**Palabras clave:** *Candida albicans*, PCR, necrosis pulpar, conductos radiculares

### ABSTRACT

Microorganisms are known to be the primary cause of dental pulp and periapical diseases. To date, bacteria are the most studied causal agent, although reports exist of yeasts inside root canals and as a cause of treatment failure. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *Candida albicans* in infected root canals. Primers specific to *C. albicans* gene 25sRNA were used in 77 samples from root canals with necrotic pulp with or without periapical injury. Overall *C. albicans* frequency was 2.6%, and corresponded to samples from necrotic pulp with periapical injury (8.3%, 2 of 24). PCR was shown to be an extremely sensitive method for *C. albicans* identification, and results suggest that this yeast may be involved in pulp necrosis with periapical injury.

**Keywords:** *Candida albicans*, PCR, pulp necrosis, root canals

Solicitud de sobretiros: M. en C. Sandra Elena Hernández Solís

Correo electrónico: [hsolis@uady.mx](mailto:hsolis@uady.mx)

Correspondencia: Calle 61A #492A x Av. Itzáes, Col. Centro, Mérida, Yucatán, México, CP. 97000

Recibido: Agosto 2013 / Aceptado: Octubre 2013

Artículo disponible en <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V05N2p51.pdf>

Rev Odontol Latinoam, 2013;5(2):51-55

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos juegan un papel muy importante en las agudizaciones endodónticas ya que son los principales agentes etiológicos de necrosis pulpar, lesiones periapicales y tratamientos endodónticos fallidos (1,2). Se ha reportado que la invasión de *Candida* en los conductos radiculares produce granulomas y abscesos periapicales al igual que reabsorción dentinaria externa, constituyendo una fuente de diseminación de la enfermedad a la periferia por medio del torrente sanguíneo (3).

Los microorganismos que más frecuentemente se han aislado de los conductos radiculares infectados son bacterias anaerobias (4). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de hongos del género *Candida* en la pulpa dental infectada y en túbulos dentinarios de pacientes sanos (1,3).

La prevalencia de *Candida* en los conductos radiculares va de un 7% a un 55% siendo *Candida albicans* la especie más prevalente (2,4). Los tratamientos endodónticos se enfocan en la eliminación de bacterias mediante la preparación biomecánica y la medicación intraconducto con hidróxido de calcio (1,3) y cuando la infección se extiende alcanzando los tejidos blandos, el tratamiento es complementado con antibióticos orales. Sin embargo, este tratamiento no resulta eficaz para la eliminación de *Candida albicans* ya que se ha demostrado que además de ser altamente resistentes al tratamiento, proliferan con mayor facilidad (3,5).

El diagnóstico microbiológico es un paso esencial en la identificación de microorganismos involucrados en enfermedades infecciosas (6). Para la identificación de *Candida*, existen medios de cultivo generales como el Agar Dextrosa Sabouraud y medios diferenciales cromogénicos como el CHROMagar *Candida*, así como la prueba de tubo germinativo que permiten la identificación de las especies de *Candida* (7,8).

Se han empleado diversas técnicas para la identificación de *Candida albicans*, entre las cuales destaca la técnica molecular de PCR que se basa en la identificación de características estables como el DNA, además de que es una prueba sensible y específica lo cual facilita el diagnóstico de este

microorganismo en muestras provenientes de conductos radiculares (2).

Se han realizado diversas investigaciones en las cuales se ha reportado la presencia de *Candida albicans* en conductos radiculares infectados, sin embargo, en México no existe ningún estudio publicado que demuestre la presencia de este microorganismo en este tipo de infecciones.

Con base en lo anteriormente mencionado, es importante establecer la prevalencia de *C. albicans* en conductos radiculares infectados para saber si este microorganismo pudiera ser el causante de dichas infecciones y considerarlo en estrategias de tratamiento que incluya su eliminación, para un mejor tratamiento en este tipo de infecciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de 77 conductos radiculares con necrosis pulpar con o sin lesión periapical, de igual número de pacientes que acudieron al Posgrado de Endodoncia, de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Toma y recolección de muestras:

Las muestras de los conductos radiculares fueron tomadas con una extrema asepsia, según la metodología previamente descrita. La muestra se tomó con 3 puntas de papel absorbentes estériles, introduciéndolas al tercio apical con base en la radiografía de diagnóstico, estas puntas se empararon con el fluido del conducto y permanecieron en él durante 1 minuto cada una. Las puntas de papel se colocaron en un tubo de ensayo con 3ml de medio de cultivo de Tood Hewitt para su transporte al laboratorio (9,10).

Aislamiento e identificación:

Las muestras recolectadas se inocularon en Agar Dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones aeróbicas. Al cabo de este tiempo, se seleccionaron las colonias de color blanco y de consistencia cremosa que presentaron características de *Candida* (11,12). Las colonias seleccionadas fueron inoculadas en CHROMagar *Candida* y se incubaron en una estufa bacteriológica a 37° C durante 48 horas, pasado este tiempo se observó la coloración de las colonias (13). Las colonias que presentaron características microbiológicas de *C. albicans* fueron confirmadas

utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Confirmación molecular:

La extracción de DNA se realizó por medio de la técnica de Calentamiento-Congelamiento, la cantidad de DNA extraído se midió por espectrofotometría (12).

Para la técnica de PCR se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos, uno específico para el género *Candida* y otro para la especie *C. albicans*. Los oligonucleótidos para el género *Candida* amplificaron a 610 pb del gen 25SrRNA (RNAF 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' y RNAR 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3') y los de la especie *C. albicans* amplificaron a 175 pb (CAL5 5'-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG-3' y NL4CAL 5'-AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTA/TAA-3') (14). El paso final involucro la extensión de cada oligonucleótido para lo cual se trabajó con una mezcla de reacción a un volumen final de 25 µl: 1 µl del ADN, 2.5 µl de buffer PCR 1X, 1.25 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de cada oligonucleótido, 0.5 µl de dNTPs, 0.5 µl de Taq polimerasa (Invitrogen) y 14.25 µl de agua inyectable (14-16). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: calentamiento a 95°C x 6 min., 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 58°C, 30seg. a 72°C y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10min. En cada amplificación se incluyó un control positivo y uno negativo (14,16). Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en Buffer TBE (Tris-EDTA-Borato de sodio) 1X a un voltaje constante de corrida de 100V durante 1 hora. En cada gel se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

El gel se tiñó con bromuro de etidio, se observó con la ayuda de una lámpara de luz UV y se fotografió (14,16).

**RESULTADOS**

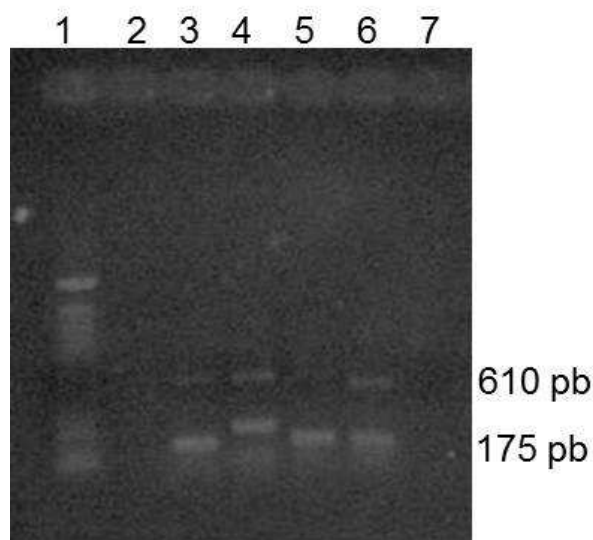
De las 77 muestras provenientes de conductos radiculares infectados con necrosis pulpar, 24 (31.2%) presentaron lesión periapical y 53 (68.8%) no presentaron lesión periapical (Tabla 1).

Del total de muestras estudiadas, en 2 (2.6%) se obtuvieron cepas con características microbiológicas de *Candida albicans*, ya que presentaron cultivos de color verde en el medio CHROMagar *Candida*.

**Tabla 1.** Pacientes estudiados con necrosis pulpar, con y sin lesión periapical y cultivos positivos a *C. albicans*

Lesión Periapical	No.	%	Positivas a <i>C. albicans</i>	%
Si	24	31.2	2	8.3
No	53	68.8	0	0.0
Total	77	100.0	2	2.6

Al realizar la prueba de PCR, para las dos cepas con características microbiológicas de *Candida albicans*, amplificaron fragmentos de peso molecular de 610pb y 175pb, correspondientes al género *Candida* y a la especie *albicans* respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** PCR. Marcador de PM de 100 pb (carril 1), cepa de referencia de *C. albicans* ATCC10231 (carril 3), control positivo de *C. dubliniensis* AC031 (carril 4), cepas de *C. albicans* aisladas de conductos radiculares (carriles 5 y 6), controles negativos (carriles 2 y 7).

Las cepas de *C. albicans* identificadas en este estudio provinieron de dos muestras de dientes con lesión periapical. No se encontró *Candida* en dientes necróticos con ausencia de lesión periapical. Considerando solo la muestra de dientes con lesión periapical, el porcentaje se elevó al 8.3%. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ), que permitiera asociar la presencia de *C. albicans* con la lesión periapical.

**DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos del presente estudio permitieron conocer la frecuencia de *Candida albicans* en conductos radiculares con necrosis pulpar de pacientes que acudieron a la Clínica de

Posgrado en Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Se han llevado a cabo diversos estudios en donde se ha reportado la prevalencia de *C. albicans* en pulpas necróticas, estudios realizados en Estados Unidos reportan prevalencias que van del 18% al 40% (9,10,17). Un estudio realizado en Colombia reporta una prevalencia del 5% (18), en tanto que en Brasil, Siqueira y cols, en dos estudios, reportan prevalencias de *C. albicans* del 6% (19) y del 2% en conductos con pulpa necrótica, en este último estudio se utilizó la técnica de PCR para la identificación de *C. albicans* (20).

En este estudio la prevalencia de *Candida albicans* fue del 2.6%, similar a lo reportado por Siqueria y cols. (20), sin embargo, si consideramos el porcentaje en conductos necrótico con lesión periapical nuestros resultados se encuentran por encima de los reportado por estos autores (8.3%). No existen estudios que reporten una asociación entre la presencia de *C. albicans* y la edad, género y estado de salud de los pacientes con necrosis pulpar, en este estudio las cepas identificadas provinieron de pacientes sanos los cuales no referían ser diabéticos o hipertensos, ambos pacientes pertenecían al género masculino mayores de 50 años. Sin embargo, estos datos no son suficientes para establecer tal asociación.

No se ha reportado la asociación entre *C. albicans* y la presencia de dolor o caries, así como que la ingesta de antibióticos por parte del paciente represente un factor de importancia para la presencia de estas levaduras. En este estudio, uno de los pacientes a los que se le aisló *C. albicans* refirió estar tomando antibióticos orales durante el tratamiento y con tres días de anticipación. Ningún paciente presentó dolor y las piezas aisladas presentaban necrosis pulpar con periodontitis apical crónica, ambos órganos dentarios presentaban caries moderada sin comunicación pulpar.

Los microorganismo bacterianos han sido mencionados como los principales agentes etiológicos de las enfermedades pulpares, lo que repercute en la falta de tratamientos o técnicas que también incluyan la eliminación de levaduras como *C. albicans*.

Existen estudios que muestran que *Candida albicans* es resistente a la medicación intraconducto y a

antibióticos orales utilizados en la terapia endodóntica de rutina, de tal modo que las técnicas convencionales de desinfección de los conductos radiculares no son suficientes para eliminarla. *C. albicans* ha mostrado resistencia al hidróxido de calcio, clorhexidina e hipoclorito de sodio. Solamente al cabo de una hora de exposición dichos antisépticos han mostrado eficiencia, sin embargo, resulta complicado llevarlo a cabo durante el tratamiento endodóntico (1,5,21,22).

Estudios de este tipo son necesarios para determinar la epidemiología de *C. albicans* en conductos radiculares infectados y así poder establecer su papel como posible agente etiológico de esta infección. Los datos de este estudio contribuirán a la implementación de medidas terapéuticas que además de enfocarse a la eliminación de microorganismo bacterianos incluyan la eliminación de otros microorganismos como las levaduras del género *Candida*.

## CONCLUSIONES

La prevalencia de *Candida albicans* en conductos radiculares con pulpa necrótica fue del 2.6%

El grupo de pacientes con necrosis pulpar y presencia de lesión periapical presentó una presencia de *C. albicans* de 8.3%.

Es importante que se lleven a cabo estudios de este tipo, utilizando el mismo protocolo de identificación, para establecer con la misma precisión la epidemiología de *C. albicans* en México.

## REFERENCIAS

1. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990; 16(12): 580-8.
2. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004; 9: 1-10.
3. Mustafa A, Bedriye G, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(5): 626-8.
4. Dartar MO, Kiyan M, Gerceker D. Antimicrobial effect, in vitro, of guta-percha points containing root canal medications against yeasts and *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(3): 410-6.

5. Zehnder M, Baumater G, Marquardt K, Paqué F. Prevention of bacterial leakage through instrumented root canals by biactive glass S53p4 and calcium hydroxide suspensions in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod.* 2007; 103(3): 423-428.
6. Rivero R, Vidal GI, Ogeira J. Utilidad de las pruebas microbiológicas, histológicas e inmunológicas en el diagnóstico de candidiasis oral. *Rev. Semg.* 2003; 59(12): 672-676.
7. Ponton J. Diagnostico de la micosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 2002; 19: 25-29.
8. Godoy P, Almeida LP, Lopes A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico albicans ID. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001; 18(6): 197-199.
9. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000; 26(12): 695-698.
10. Peciuline V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34: 429-434.
11. Laskman P, Samaranyake T, MacFarlane W, Williamson MI. Comparison of Sabouraud Dextrose and Pagano-Levin Agar Media for detection and isolation of yeasts from oral samples. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(1): 162-164.
12. Hartug C, Mata E, Abate T, Waard J, Pérez C. Extracción simplificada de ADN en especies de *Candida*. *Revista Soc Ven Microbiol [Revista on-line]\** 2005.[consultado 10 de marzo de 2008]; 25(2): 116-16.
13. Ruiz J, Garcia P, Puerto JL, Marin P, Moya P. Evaluacion de un nuevo medio CHOMagar *Candida* para identificación presuntica de levaduras. *Rev. Diagn. Biol.* 2003; 52(1): 1-8.
14. Yang CW, Barkham TMS, Chan FY, Wang Y. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1):472-474.
15. Bautista C, Boldo XM, Villa TL, Hernández C. Identificación de *Candida* spp. By randomly amplified polymorphic DNA análisis and differentiation *Candida albicans* and *C. dubliniensis* by direct PCR methods. *J.*
16. 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(9): 3223-3231.
17. Sen BH, Piskin B, Demirci D. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11: 6-9.1997; 84: 68-73.
18. Rodríguez P, Catero J. A. Microbiología pulpar de dientes integros con lesiones apicales de origen idiopático. *Colom Med.* 2008; 39(1). 5-10.
19. Siqueira JF, Rocas IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 174-178.
20. Siqueira JF, Rocas IN, Moraes S.R, Santos K. N. Direct amplification of rRNA gene sequences for identificación of selected oral pathogens in root canals infections. *Int Endod J.* 2002; 35: 345- 351.
21. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod.* 1999; 25: 235-238.
22. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5): 632-640.