

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

UNIDAD DE POSTGRADO



**FRECUENCIA DE *CANDIDA ALBICANS* EN PERIODONTITIS PERIAPICAL
ASINTOMATICA PRIMARIA Y SECUNDARIA, EN PACIENTES DE LA
ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA
U.M.S.A**

POSTULANTE: Dra. Denniz Sonia Ventura Nogales

TUTOR(ES): Dra. María Teresa Álvarez

Lic. Lexin Ramel Arandia Saravia

**Trabajo de Grado presentado para optar al título de
Especialista en Endodoncia**

La Paz – Bolivia

2024

DEDICATORIA

Dedico este Trabajo de Grado ante todo a Dios por darme la capacidad y sabiduría para lograr esta investigación.

A mis padres porque ellos son la motivación de mi vida mi orgullo de ser lo que soy.

Tambien la dedico a mi hijo Joel quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para él.

A mis hermanos Lourdes Ruth. y Juan Carlos y a mi tía Daisy porque son la razón de sentirme tan orgullosa de culminar mi meta, gracias a ellos por confiar siempre en mí.

A cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Al Lic. Lexin Arandia por guiarme en la elaboración de mi proyecto de grado.

A la Dra. María Teresa Álvarez por abrirme las puertas de la Facultad de Bioquímica y Farmacia donde realice el procesamiento de las muestras.

A quien me ha dirigido a la Dra. Carla Alejandra Miranda, por su interés y dedicación, aprendí mucho de usted.

INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCION	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.3.1 IDENTIFICACION DEL PROBLEMA.....	6
1.3.2 ANALISIS DEL PROBLEMA	7
1.4 JUSTIFICACION	8
1.5 OBJETIVOS.....	9
1.5.1 OBJETIVO GENERAL	9
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
1.6.1 ALCANCE TEMPORAL.....	9
1.6.2 ALCANCE GEOGRÁFICO	10
1.6.3 ALCANCE INSTITUCIONAL	10
1.7.1 TIPO DE INVESTIGACION.....	10
1.7.2 TAMAÑO Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.7.2.1 POBLACIÓN de estudio	11
1.7.2.2 MUESTRA.....	13
1.8 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.....	13
1.8.1 AVAL DEL comité DE ETICA Y BIOETICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.M.S.A.	13
1.9 Recolección de datos del paciente:	14
1.9.1 HISTORIA CLÍNICA	14
1.9.2. METODOS DE RECOLECCION DE LA MUESTRA.....	14
1.10 CEPAS.....	15
1.10.1 EXTRACCION DEL DNA	16
1.10.2 PCR CONVENCIONAL CON PRIMERS GENERALES Y ESPECÍFICOS. (MANUAL DE INSTRUCCIÓN DE QUIT DE PROMEGA DE WIZARD)	16
CAPITULO II.....	20
2.1 MARCO TEORICO	20
2.1.1.- INTRODUCCION	20
2.1.2.- INFECCIONES PULPARES.....	20
2.1.2.1.- PULPA SANA	20

2.1.3.- PATOLOGÍA PULPAR	21
2.1.4.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PULPAR APROBADO POR LA AAE Y ABE	23
2.1.4.1.- PULPITIS REVERSIBLE	23
2.1.4.2.- PULPITIS IRREVERSIBLE	24
2.1.4.2.1.- PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA	24
2.1.4.2.2 PULPITIS IRREVERSIBLE ASINTOMÁTICA	25
2.1.4.3 NECROSIS PULPAR	25
2.1.4.4 PREVIAMENTE TRATADA	26
2.1.4.5 TRATAMIENTO INICIADO PREVIAMENTE	26
2.2 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD APICAL APROBADO POR LA AAE Y ABE	27
2.2.1 TEJIDOS APICALES NORMAL	27
2.2.2. - PERIODONTITIS APICAL SINTOMÁTICA	27
2.2.3. - PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA	27
2.2.4 ABSCESO APICAL AGUDO	28
2.2.5 ABSCESO APICAL CRONICO	28
2.3 PARTICIPACIÓN DE LOS HONGOS EN CAVIDAD ORAL	29
2.3.1 PARTICIPACIÓN DE LA <i>CANDIDA ALBICANS</i> EN LAS PERIODONTITIS PERIAPICAL ASINTOMÁTICA PRIMARIA	29
2.3.2 PARTICIPACIÓN DE LA <i>CANDIDA ALBICANS</i> EN LAS PERIODONTITIS PERIAPICAL ASINTOMÁTICA SECUNDARIA	30
2.4 <i>CANDIDA ALBICANS</i>	32
2.4.1 TAXONOMÍA.....	32
2.4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA <i>C. ALBICANS</i>	32
2.4.3 IMPLICANCIA DE LA <i>CANDIDA ALBICANS</i> EN ENDODONCIA	34
2.4.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE LA <i>CANDIDA ALBICANS</i> EN EL CONDUCTO DENTARIO	36
2.4.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA <i>CANDIDA ALBICANS</i> EN EL TEJIDO DENTINARIO.....	37
2.4.6 BIOPELÍCULAS Y LA <i>CANDIDA ALBICANS</i>	40
2.4.6.1 MORFOLOGÍA DEL BIOFILM	40
2.4.6.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM.....	41
2.4.6.3 MECANISMO DE DEFENSA DEL BIOFILM.....	41

2.5 TECNICAS DE LA REACCION DE CADENA DE LA POLIMERASA MOLECULAR Y ANALISIS MICROBIOLOGICO.....	42
2.5.1 EXTRACCION DE DNA, tratamiento Pre- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	42
2.5.2 AMPLIFICACION DE SECUENCIAS DE ADN, REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	45
2.5.3 ELECTROFORESIS.....	46
CAPITULO III.....	49
3.1 RESULTADOS.....	49
3.1.1 ANALISIS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	49
3.2 RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	51
3.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	53
3.4 DISCUSION	56
3.5 CONCLUSIONES	57
3.6 RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
REFERENCIAS WEB	
ANEXOS	
ANEXO Nº 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO	
ANEXO Nº 2 COMITÉ DE ÉTICA Y BIOÉTICA APROBADO POR MEDICINA	
ANEXO Nº 3 HISTORIA CLINICA DE LA ESPECIALIDAD	
ANEXO Nº 4 FOTOGRAFÍA DE AISLAMIENTO ABSOLUTO CON GOMA DIQUE	
ANEXO Nº 5 FOTOGRAFÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA U.M.S.A.	
ANEXO Nº 6 FOTOGRAFÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA U.M.S.A.	
ANEXO Nº 7 FOTOGRAFÍA DE LA CLINICA DE ESPECIALIDAD U.M.S.A.	
ANEXO Nº 8 FOTOGRAFÍA DE RESULTADO DE ELECTROFORESIS.	

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Concentración de Preparado para el Mix de PCR.....	17
Tabla N° 2 Secuencia de los Primers utilizado para <i>Candida albicans</i>	17
Tabla N° 3 Protocolo de Termocicladores (Bioer Life Pro).....	18
Tabla N° 4 Distribución de la población de estudio	49
Tabla N° 5 Descripción de la población en estudio.....	50
Tabla N° 6 Distribución de la población con diagnostico primario.....	50
Tabla N° 7 Distribución de la población con diagnostico secundario.....	51
Tabla N° 8 Presencia y ausencia de los genes marcadores específicos.....	52
Tabla N° 9 Resultados de la PCR para <i>C. albicans</i> en la población de estudio.....	53
Tabla N° 10 Resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa de acuerdo al género	53
Tabla N° 11 Resultados positivos de la población en estudio.....	54
Tabla N° 12 Resultados Positivos de PCR para <i>C. albicans</i>	55
Tabla N° 13 Resultados Positivos de PCR de acuerdo al diagnóstico para <i>C. albicans</i> de la población de estudio.....	55
Tabla N° 14 Resultados Positivos de la población en estudio.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Hallazgos de los Estudios de Prevalencia de <i>Candida albicans</i>	4
Figura N° 2 Árbol del Problema.....	7
Figura N° 3 Procedimientos de Examen Requeridos para Realizar Diagnostico endodóntico.....	22
Figura N° 4 Periodontitis periapical asintomática.....	28
Figura N° 5 Esquema de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	34
Figura N° 6 <i>Candida albicans</i> adhiriéndose e invadiendo a un túbulo dentinario.....	36
Figura N° 7 Corte transversal donde se observa penetración a tubulos dentinarios..	38
Figura N° 8 Microfotografía con Microscopio E. de Barrido corte longitudinal.....	38
Figura N° 9 Representación porcentual de las muestras con respecto al género.....	54

RESUMEN

El fracaso de los tratamientos endodónticos está enfocado al contenido de los conductos radiculares, al tener una alta frecuencia de consultas por fracasos endodónticos en la especialidad de endodoncia, se propone realizar un trabajo de tipo exploratorio, para identificar la frecuencia de *Candida albicans* en el interior de los conductos relacionados con el diagnóstico de periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria, mediante metodología molecular de PCR procesadas en el laboratorio del Instituto de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Farmacia.

Se recolectaron 59 muestras de las cuales se encontraron 5 muestras positivas a *Candida albicans*, estas muestras están distribuidas con el diagnóstico de Periodontitis Periapical asintomática primaria que representa el 60% de casos positivos a diferencia de la Periodontitis Periapical secundaria con menor frecuencia con el 40%, de acuerdo al grupo de edad: 40% de casos positivos corresponden al grupo de 12 a 29 años, los pacientes masculinos representan el 80% de casos positivos y las piezas dentarias que mostraron con mayor frecuencia fueron los premolares representando el 60%. Se concluye que en las muestras estudiadas se encontró una baja frecuencia de presencia de *Candida albicans* asociada a fracasos endodónticos en Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria en pacientes de la Especialidad de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la U.M.S.A. por lo que se recomienda llevar a cabo más estudios de este tipo utilizando el mismo protocolo de identificación para *Candida albicans* en muestras más amplias.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La periodontitis apical es el resultado de una enfermedad de los tejidos periapicales causadas por bacterias y otros productos microbianos como la *Candida albicans*, que son persistentes en el sistema del conducto radicular. Inicialmente la pulpa se encuentra en un estado estéril pero una vez que las barreras fisiológicas pierdan su integridad, el complejo dentino pulpar se encuentra expuesto al medio bucal y posterior contaminando el tejido pulpar. El ingreso de las microbiotas puede deberse a varios factores, como la caries dental profunda, por el uso del instrumental contaminado durante la preparación biomecánica inicial del conducto radicular, el otro camino común para la contaminación por la saliva debido al no emplear el aislamiento absoluto permitiéndole el ingreso a los microorganismos dentro del sistema radicular.

El reto para la endodoncia es erradicar estos microorganismos presentes en el interior del conducto radicular mediante una adecuada preparación biomecánica. Para un adecuado trabajo de la endodoncia a nivel de la especialidad se tiene varias técnicas para conseguir un control de la enfermedad para poder mantener la pieza dentaria en boca, pero en algunos casos no se consigue un adecuado examen complementario de diagnóstico esto por el desconocimiento que tenemos para identificar aquellos posibles microorganismos causantes de fracaso del tratamiento, en tanto que nuevas técnicas nos ayudaran a mejorar en las maniobras que puedan guiar a un mejor manejo de la enfermedad, por lo tanto cuando el especialista conoce el protocolo o métodos de la toma de muestra de microorganismos podría mejorar su técnica profesional.

El objetivo de este estudio fue identificar la frecuencia de *Candida albicans* en los conductos radiculares con el diagnóstico de las Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria en pacientes perteneciente a la clínica de Especialidad de

Endodoncia de la Facultad de Odontología de la U.M.S.A. a través de una prueba laboratorial de PCR procesada en el laboratorio del Instituto de Biología Molecular.

1.2 ANTECEDENTES

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica de investigaciones con referencia a la técnica molecular utilizada, se analizó la literatura sobre la presencia de hongos en las infecciones del conducto radicular específicamente a la *Candida albicans*, se tomó artículos científicos relevantes, revistas de endodoncia referida al tema, en especial aquellos que referían la presencia de la *Candida albicans* en las periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria.

Según el artículo publicado el 2012 por Aysin D. y Cols., con el tema Reacción en cadena de la polimerasa de *Enterococcus Faecalis* y *Candida Albicans* en Periodontitis Apical de pacientes Turcos, el objetivo fue investigar la presencia de *E. faecalis* y *C. albicans* en las infecciones endodonticos utilizando el método molecular de PCR, estudio realizado con un total de 117 muestras de las cuales 23 fueron con resultado positivo a *C. albicans*.

El estudio realizado por Poptani B. y Cols. en el año 2013, con el tema Detection Of Enterococcus Faecalis And Candida Albicans In Previously Root-Filled Teeth In A Population Of Gujarat With Polymerase Chain Reaction, método utilizado la PCR por ser más sensible que el cultivo, estudio realizado con un total de 20 muestras de las cuales 7 resultaron positivo.

Según el artículo publicado el 2013 del autor Romero y Cols., con el tema Identificación mediante PCR de la *Candida albicans* aisladas de conductos radiculares necróticos, este estudio fue determinar mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa la presencia de *Candida albicans* en conductos radiculares infectados, en 77 muestras totales provenientes de conductos

radiculares con pulpas necróticas con o sin lesión periapical, la frecuencia de *Candida albicans* encontrada fue de 2 como positivo a *C. albicans*.

Según el artículo publicado el 2016 del autor Galarraga M. y Cols., con el tema Identificación Molecular y Asociación Causal de Microorganismos presentes en Lesiones Periapicales Refractarias al Tratamiento Endodóntico, realizaron un estudio de casos y controles para comprobar la presencia de bacterias y levaduras y asociar su causalidad de las lesiones periapicales utilizando el método molecular y microscopia, estudio realizado con 55 pacientes con lesión y sin lesión periapical de las cuales 4 muestras resultaron positivos a *C. albicans*.

Según el artículo publicado el 2017 del autor Persoon I. y Col., con el tema Prevalencia y naturaleza de los hongos en el conducto radicular infectados: una revisión sistemática y meta análisis, el objetivo de este estudio fue una revisión de la literatura para encontrar la prevalencia y diversidad de hongos en raíces infectados, en 54 muestras de las cuales fue del 7,5% positivo a *C. albicans*.

El estudio realizado en la clínica de Microbiología Europea el año 2019 con el tema Prevalence of *Candida albicans* in Primary Endodontic Infections Associated with a higher Frequency of Apical Periodontitis in type two Diabetes Mellitus Patients, emplearon el método molecular para este estudio, tomaron dos grupos de estudio; uno con diabetes millitus tipo2 de 60 paciente y el otro sin diabetes también de 60 con el total de 120 en estudio de las cuales 65% resultaron positivo a *C. albicans* con diabetes millitus tipo dos, en los pacientes de larga evolución tenían esta infección con *C. albicans*.

A continuación se mostrara en el siguiente cuadro la identificación empleado tanto para periodontitis periapical asintomática primaria como para periodontitis periapical asintomática secundaria.

Figura Nº 1. Hallazgos de los Estudios de Frecuencia de *Candida albicans*

Autores	Lugar	Titulo	Intervención de interés	Nº de muestras	Muestras positivas	(% Positivos)
De La Torre R. y Col.	Clinical Microbiology European, 2019	Prevalencia de <i>Candida albicans</i> en infecciones endodonticos primarias asociada a una mayor frecuencia de periodontitis apical en pacientes con diabetes mellitus tipo 2	Estudio laboratorial	120: -60 con DMT2 -60 No diabéticos	33	65%
Persoon I. y Cols.	2017, Brasil	Prevalencia y naturaleza de los hongos en las infecciones del conducto radicular: una revisión sistemática y un metanálisis	Estudio de prevalencia	54		7.5%
Galarraga M. y Cols.	Ecuador,	Identificación molecular y asociación causal de microorganismos presentes en	Estudio laboratorial	55	4	20%

	2016	lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóntico				
Romero y Cols.	2013, México	Identificación mediante PCR de <i>Candida albicans</i> aisladas de conductos radiculares necróticos	Estudio laboratorial	77	2	8.3%
Poptani B. y Cols.	2013, India	Detección de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> en dientes previamente enraizados en una población de Gujarat con reacción en cadena de la polimerasa	Estudio de prevalencia	20	7	35%
Aysin D. y Cols.	2012, Turkía	Reacción en cadena de la polimerasa de <i>Enterococcus Faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> en periodontitis apical de pacientes turcos	Estudio de frecuencia	117	23	20%

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de la clínica de la Especialidad de endodoncia en la Facultad de Odontología realizan consultas de las cuales se encuentran muchos pacientes con fracasos endodonticos y son reportados en la gestión 2015 y 2016, 117 pacientes de los cuales 46 resultaron con fracasos endodonticos, es decir que necesitan retratamiento porque pueden estar relacionadas con la persistencia de algunos microorganismos de los cuales uno de ellos puede estar relacionada con la presencia de la *C. albicans*, para saber si este microorganismo es el causante de las infecciones o persistencia en los conductos radiculares.

Estos casos de fracasos son posiblemente debido a múltiples factores como ser; al no tomar recaudos necesarios durante la apertura a cámara pulpar, también al no seguir los protocolos que exige al realizar el tratamiento de conducto, entre otros.

Precisamente para evitar dolor al masticar he inflamación de la encía que está cercana al diente tratado o ingerir medicación, también ocasiona desconfianza del paciente y por consiguiente evitar a una posible pérdida de la pieza dentaria, es importante saber qué tipo de microorganismo pueda ser la causa de fracasos endodonticos y poder tomar los recaudos necesarios.

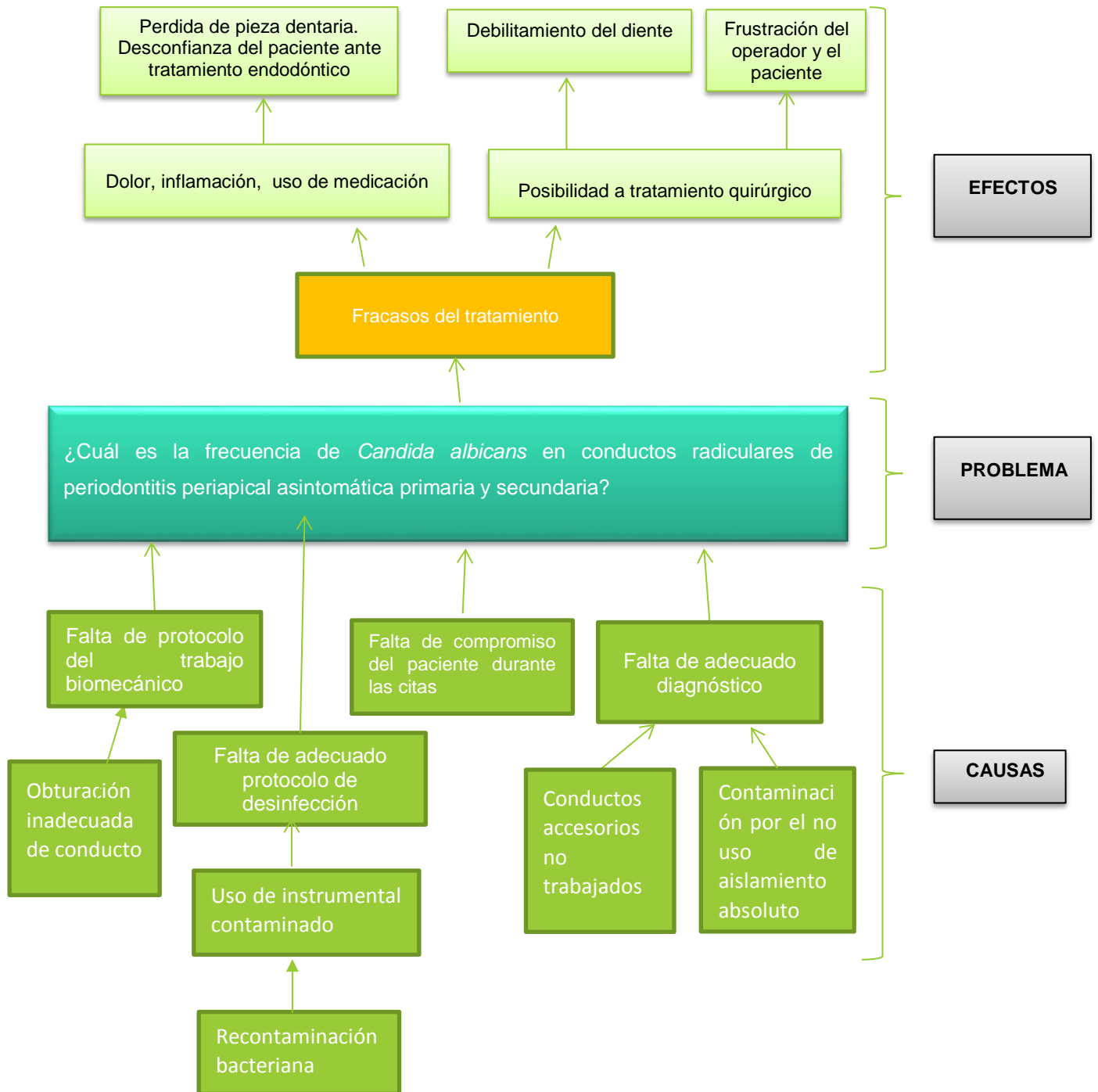
1.3.1 IDENTIFICACION DEL PROBLEMA

El problema que se plantea es:

¿Cuál es la frecuencia de *Candida albicans* en conductos radiculares con diagnóstico de periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria?

1.3.2 ANALISIS DEL PROBLEMA

Figura 2. Árbol del problema



1.4 JUSTIFICACION

Es de suma importancia realizar un buen diagnóstico y con la ayuda de exámenes complementarios para poder abordar un retratamiento de conducto, además seguir con los protocolos adecuados en el momento de la desinfección de los conductos radiculares por parte del profesional y evitando los posibles fracasos del tratamiento de conducto he incluso el estrés del profesional. También ayuda para dejar una evidencia científica en el área de la endodoncia a cerca del manejo laboratorial de las muestras intraradiculares tomadas del interior del conducto radicular y posteriormente procesadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Farmacia, es importante que se realicen el mismo protocolo de proceso de la muestra para saber la presencia o ausencia de la *C. albicans*.

Para el área de la metodología, se identifica la presencia de la *C. albicans* en las Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria en aquellos pacientes que acudieron a la clínica de la Especialidad de Endodoncia para que se pueda demostrar que si es identificable la *C. albicans* cumpliendo con el protocolo adecuado del método molecular de PCR. Gracias al desarrollo de la técnica molecular se han desarrollado diversos métodos y técnicas para el estudio y la identificación de microorganismos asociados al fracaso del tratamiento endodóntico, estos métodos por tanto ayudan a la detección de los patógenos de forma rápida y eficaz por ende nos facilitan su diagnóstico.

Con este estudio ayudara para los pacientes, para tener un mejor protocolo de atención en los casos de retratamiento, de esta manera el porcentaje de éxito endodóntico aumentara dando lugar a una mayor confiabilidad del tratamiento a la población en general y disminuyendo la posible pérdida de la pieza dentaria a causa de la presencia de dicho microorganismo y dándole la mejor calidad de vida a la sociedad.

Actualmente existen diversos métodos y técnicas más avanzados para poder identificar el tipo de microorganismo que llevan al fracaso, es importante introducirnos a estas últimas tendencias en investigación para tener éxito en los tratamientos y un mejor pronóstico para la pieza dentaria.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la frecuencia de *Candida albicans* en conductos radiculares con el diagnóstico de Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria en la clínica de la Especialidad de Endodoncia.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los pacientes que presentan el diagnóstico de periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria de la especialidad.
- Describir el método Molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Recolectar las muestra en los pacientes con Periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria que acudieron a la Especialidad de Endodoncia.
- Describir la técnica de toma de muestra.
- Describir la técnica laboratorial.

1.6 ALCANCE

1.6.1 ALCANCE TEMPORAL

Se recolectaron las muestras a pacientes que acudieron a la clínica y el procesamiento de las muestras obtenidas todo ello fue en un periodo de Mayo a Septiembre.

1.6.2 ALCANCE GEOGRÁFICO

El estudio se realizó en la Facultad de Odontología, ubicado en el macro-distrito 7 centro, en el distrito 1 de la zona Miraflores Avenida Saavedra frente hospital de clínicas de la ciudad de La Paz Bolivia (Ver anexo 6).

El procesamiento de la muestra se realizó en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas de la U.M.S.A. Ubicado en el Macro-distrito 7 ubicada en la Av. Saavedra N°2224. (Ver anexo 7).

1.6.3 ALCANCE INSTITUCIONAL

El estudio y toma de muestra se realizó en la clínica de la Especialidad de Endodoncia (Ver anexo 8) de la Facultad de Odontología de la U.M.S.A. y en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas de la U.M.S.A.

1.7 DISEÑO METODOLOGICO

1.7.1 TIPO DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación es de tipo transversal ya que se tomaron los datos en un solo momento, también es descriptivo ya que se realizó un sondeo del problema en forma general y superficial de un tema poco estudiado en la clínica de la Especialidad de Endodoncia, además es un estudio cuantitativo también los resultados se muestran de forma numéricas y en gráficos.

La técnica que se empleo fue la PCR es un método molecular caracterizada por replicar pequeños fragmentos de ADN. Además, por ser un método sensible y confiable de muestras obtenidas en el interior de los conductos radiculares.

Las fuentes de información primarias y secundarias obtenidas de artículos científicos y libros referentes al tema y de los procesamientos de las muestras. El método molecular de PCR se procesó y analizó mediante la observación de campo y observación laboratorial de las muestras obtenidas de los pacientes que formaron parte de la investigación.

1.7.2 TAMAÑO Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

1.7.2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El universo en estudio presenta cinco características que detallaremos a continuación:

1. Cantidad

La atención en la clínica de especialidad de Endodoncia se inició a finales de la gestión 2014 y 2015, por medio de la observación documental se obtuvo información de secretaria de la especialidad de Endodoncia, se revisó en la base de datos donde se atendió a 117 pacientes en este periodo, con el diagnostico de Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria tanto varones como mujeres. El 39% (46) de los casos presentados fueron tratamientos fallidos indicados para realizar retratamientos. Durante los meses de estudio de mayo a agosto del 2016 se

podieron atender a un total de 59 pacientes con periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria los cuales accedieron a ser parte de esta investigación.

2. Calidad

La población que se tomó en cuenta para este estudio entre varones y mujeres atendidos con el diagnóstico de Periodontitis Periapical Asintomática Primaria y Secundaria comprendidos entre las edades de 12 a mayores de 49 años, que buscaban atención clínica y respaldados con una radiografía periapical tomada en la misma clínica.

3. Pertenencia

La colecta de muestras tomadas que se procesaron en este estudio pertenecen a los pacientes que acudieron a la clínica de la Especialidad de Endodoncia con previa aceptación de los pacientes por medio de un consentimiento informado y una hoja informativa, (Ver Anexo 1) que fue analizado y aceptado por el comité de ética de la facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés. Se consideró la colecta de las muestras aquellos pacientes que acudieron a la especialidad de endodoncia de la Facultad de Odontología UMSA, en busca de tratamiento endodóntico en aquellos que tuvieron con este tipo de diagnóstico, cumpliendo con los criterios de inclusión para el estudio.

4. Espacio Geográfico

La toma de muestras se realizó en el interior de la clínica de Especialidad de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la U.M.S.A., el análisis y proceso de estas muestras mediante la PCR se desarrolló en el laboratorio del Instituto Técnico de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.M.S.A.

5. Espacio Temporal

El periodo de la toma de muestra fue realizado en un periodo comprendido de Mayo a Agosto del 2016, a diferencia del procesamiento de la muestra fue de Mayo a Septiembre.

1.7.2.2 MUESTRA

En la clínica de la especialidad de endodoncia de la Facultad de Odontología de la U.M.S.A. acudieron un total de 117 pacientes, de los cuales se presentaron 59 casos con el diagnóstico de Periodontitis representando esta cantidad la muestra de estudio, esto entre los meses de mayo a agosto de la gestión 2016.

1.8 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

1.8.1 AVAL DEL COMITÉ DE ETICA Y BIOETICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.M.S.A.

El perfil de esta investigación se presentó ante el Comité de Ética y Bioética de Proyectos de Investigación con Seres Vivos de la facultad de Medicina de la U.M.S.A., en busca de su aprobación con respecto a la toma de muestras tanto en el protocolo, objetivos y otros aspectos referentes a dicha investigación.

El comité de ética y bioética avalo el proyecto (Ver anexo 2), otro de los requisitos más relevantes para la obtención de dicha aprobación, fue la presentación del Consentimiento Informado (Ver anexo 1). El cual explica de una manera clara y entendible las características del procedimiento de la toma de muestras y sus objetivos finales a los pacientes candidatos para formar parte de esta investigación, consintiendo su participación por medio de una firma si así fuera su deseo.

1.9 RECOLECCIÓN DE DATOS DEL PACIENTE:

1.9.1 HISTORIA CLÍNICA

Las historias clínicas provistas por la especialidad, (Ver anexo 3) fueron llenados con los siguientes datos del pacientes: Edad, genero, antecedentes sistémicos, pieza dentaria, tratamientos con infecciones primarias y secundarias, datos referidos al dolor (tipo, duración, intensidad) inspección de tejidos duros, blandos, exploración de cámara pulpar, pruebas de percusión, palpación, vitalidad pulpar y movilidad dental, historia de terapias antibióticas, radiolucides periapical determinada mediante radiografías periapicales.. En el caso de la periodontitis periapical asintomática secundaria el tratamiento anterior debe tener una data de dos años por lo menos.

1.9.2. METODOS DE RECOLECCION DE LA MUESTRA

En clínica se acomodó al paciente en el sillón dental y se preparó para realizar aislado absoluto con clams estériles y desinfectando el campo operatorio.

A continuación, se detallan los pasos de toma de muestra:

- Se acomodó al paciente en el sillón dental
- Colocación de anestesia en caso de requerirla
- Previo se realizó limpieza de las piezas dentarias con piedra pomes
- Aislado absoluto con goma dique y arco de Young y clamps (Ver anexo 4)
- Desinfección con 3ml de hipoclorito de Na al 2.5%
- Se remueve la restauración si es que tuviera
- Se vuelve a desinfectar el campo con hipoclorito de Na al 2.5%, 5 ml
- Inactivación del hipoclorito de Na con 5ml tiosulfato de Na al 5 % por 30seg.

- Los conductos obturados se desobturaron con limas H 15, 20, 25, (Densply Maillefer), dependiendo del diámetro del conducto.
- No se utilizara ningún solvente, para no interferir en la muestra.
- La longitud de trabajo se tomará con detector apical (propex pixi de la Densply Maillefer)
- La lima que se introdujo fue Lima 15, 20, 25, H (hedstrom maillefer) dependiendo del diámetro del conducto, la cual suavemente limara las paredes con movimientos antihorario y horario.
- La lima luego de sacar del conducto se colocará en tubos ependorf estériles de 1.5ml, los cuales se mantendrán en frío (-20°C).
- Si el conducto está muy seco se introducirá un poco de agua destilada dentro de los conductos.
- 4 puntas de papel estériles se colocarán en el conducto de manera secuencial, con la longitud de trabajo y se las dejara dentro por 1 minuto.
- Retiradas las puntas de papel se introducirán en tubos de ependorf estériles de 1.5ml, los cuales se mantendrán en frío (-20°C).
- Las muestras se llevan a 37°C por dos horas en horno de secado.
- Se retiraron las muestras y se mantienen a temperatura ambiente por 24h.
- Luego se llevaron las muestras al laboratorio de biología Molecular del instituto de investigaciones fármaco bioquímicas de la facultad de bioquímica de la Universidad Mayor de San Andrés en el cuál se mantuvieron a 4°C.
- Las muestras quedan listas para su respectivo proceso de identificación. Procedimiento descrito por Aysin D. y Col., el año 2012.

1.10 CEPAS

Para realizar la optimización de la metodología microbiológica molecular, se realizó la compra de cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) obtenida como una cepa pura, fue adquirido del Instituto Nacional de Laboratorio de Salud (INLASA). El

estudio de referencia en el que se basó la compra de dicha cepa es el de Aisyn Dumani y col, el 2012.

1.10.1 EXTRACCION DEL DNA

Pre-Tratamiento de las Muestras:

A continuación detallaremos los pasos a seguir para el pretratamiento de las muestras:

- Las muestras obtenidas en conos o limas se mantuvieron a 4°C en tubos de eppendorf después del secado correspondiente.
- Después se agrego 250 uL de PBS 1x a las muestras que tienen un duplicado; y 300 uL a las muestras únicas.
- Antes de la extracción se centrifugaron las muestras hidratada de acuerdo a lo sugerido por los protocolos de extracción del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (UMSA).
- Se ejecutó el método de extracción del material genético, para levaduras se utiliza el protocolo estandarizado utilizando el kit de Promega Wizard, de acuerdo a los protocolos del fabricante.

1.10.2 PCR CONVENCIONAL CON PRIMERS GENERALES Y ESPECÍFICOS. (MANUAL DE INSTRUCCIÓN DE QUIT DE PROMEGA DE WIZARD)

1. Se realizó un control positivo de DNA extraído de un control positivo para cada cepa; en este caso se utilizaron: una cepa pura de *C. albicans*, adquiridas de INLASA.
2. Se preparó el mix de PCR con las concentraciones correspondientes de: Buffer, MgCl₂, dNTPs, Primers forward y reverse, BSA y Tag que se plasman en la siguiente tabla:

Tabla 1. Concentraciones de preparado para el mix PCR

Reactivo	[C] inicial	[C] final
Agua	-	-
Buffer	5x	1x
MgCl ₂	25mM	1.2mM
dNTPs	5Mm	0.8mM
P1	10uM	0.5uM
P2	10uM	0.5uM
BSA	10mg/ml	0.5mg/ml
Tag	5 U/L	0.03 U/L

Fuente: Biología Molecular del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas, U.M.S.A.

3. Para los primers generales: ITS1, ITS4 (23S); se utilizan 15 uL de mix de PCR y 5uL de las diluciones de DNA correspondientes; para los primers específicos: A, B (*C. albicans*), de igual forma, se utilizaron 15uL de mix y 5uL de DNA.

Tabla 2. Secuencia de los Primers utilizados para *Candida albicans*

El ADN cromosómico del candidato se amplificó utilizando los cebadores:

A	F:5'-GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G-3'
B	R: 5'-CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC-3'

Fuente: Aysin Dumani y Col., Polymerase Chain Reaction of Enterococcus Faecalis and *Candida albicans* in Apical Periodontitis from Turkish Patients, 2012.

- Tras la preparación del mix respectivo de la cepa pura de *C. albicans*, debe añadirse 15uL de las diluciones de DNA.

El control positivo fue utilizado en una dilución de 1/10 o 1/30; mientras que los extractos de DNA fueron utilizados de forma directa o en una dilución 1/10. Vale recalcar, que se obtuvieron mejores resultados al usar extractos de DNA directos, debido a la baja concentración de DNA en los mismos.

Tabla 3. Protocolo del Termocicladores (BIOER Life Pro; Applied Biosystems) Consta de temperatura, ciclos en todos los pasos de la PCR

Condiciones de PCR optimizadas para los primers generales 23S rRNA y *C. albicans*.

Primer	23S rRNA	<i>C. albicans</i>
Inicialización	94 C 3 min	95 C 15 min
Desnaturalización	94 C 30 seg	95 C 1 min
Alineamiento	56 C 30 seg	55 C 30 seg
Elongación	72 C 1 min	72 C 1 min
Extensión	72 C 5 min	72 C 10 min
Ciclos	30	35

Fuente: Biología Molecular del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas, U.M.S.A.

5. Tras mezclar el mix y el DNA se colocaron los tubos de PCR en un termocicladores (BIOER Life Pro; Applied Biosystems), según el primer utilizado, cambiando el tiempo, temperatura y el ciclaje para optimizar las condiciones.
6. Una vez finalizado el PCR, se realizó la corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%, sembrando 5 ul. La corrida se realizó durante 20-25 minutos de 100-135V.
7. Finalizando se coloca el gel de agarosa en Bromuro de Itidio durante 5-10 minutos, dependiendo de la antigüedad del mismo, y se observan los resultados en un transiluminador (ADVANCE). Manual de instrucción de kit de promega de wizard para la extracción de ADN.

CAPITULO II

2.1 MARCO TEORICO

2.1.1.- INTRODUCCION

Como en todas las ramas de la salud, en odontología uno de los deberes a cumplir es la erradicación y prevención de las enfermedades bucodentales, pero para este estudio específicamente hablaremos de la endodoncia que es el tratamiento y la eliminación de las infecciones pulpares y sus secuelas asociadas con la inflamación del sistema vasculonervioso del diente.

La endodoncia, es una especialidad de la Odontología encargada de mantener las piezas dentarias en boca, ante las diferentes afecciones pulpares, siempre y cuando se pueda controlar la infección y no represente una amenaza para el paciente.

Las infecciones pulpares como en la periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria están formadas y desarrolladas por diferentes causas, siendo uno de los más representativos los microorganismos que viven en cavidad oral y podrían tornarse patógenos, ya que se detectaron más de 700 especies de diferentes microorganismos de los cuales solo el 50% se han podido aislar e identificarlos, por medio de métodos moleculares.

2.1.2.- INFECCIONES PULPARES

2.1.2.1.- PULPA SANA

De acuerdo a American Association of Endodontists, 2013. Las piezas dentales que presentan una pulpa normal carecen de sintomatología clínica, presentan sensibilidad normal frente a los estímulos de vitalidad pulpar, puede implicar que

histológicamente la pulpa presente alguna alteración, pero desde un punto de vista “clínico” una pulpa que presenta una respuesta transitoria (1 o 2 segundos de retirar el estímulo), a las pruebas térmicas al frío se considera una pulpa normal.

Para poder tener una información más fidedigna acerca de las pruebas de vitalidad pulpar se debe tomar las mismas primero en piezas vecinas, opuestas para que el paciente pueda familiarizarse con una respuesta normal al frío y poder discriminar de una manera precisa la respuesta de la pieza en cuestión. (American Association of Endodontists, 2013).

Radiográficamente puede existir un grado de calcificación variable, pero no debe existir ningún grado de reabsorción, caries o exposición pulpar ni siquiera mecánica por lo que esta pieza con pulpa normal no requiere tratamiento endodóntico.

2.1.3.- PATOLOGÍA PULPAR

La patología pulpar en la actualidad se diagnosticaba de una forma distinta a la que antiguamente se la manejaba, más aún si hablamos desde el punto de vista clínico, es el que más se utiliza para determinar el estado del tejido pulpar y perirradicular, ya que la terminología que se utilizaba para determinar el estado de los tejidos ya mencionados se basaba en aspectos subjetivos, viéndolos desde un lado histopatológico de manera objetiva no es muy viable. (American Association of Endodontists, 2013).

Por estos y otros aspectos el 2008 la Asociación Americana de Endodoncistas realizo una Conferencia de Consenso de Terminología Diagnostica, tenían como propósito estandarizar la terminología de la clasificación pulpar y periapical. Tomando en cuenta el criterio radiográfico, clínico y pruebas objetivas. (American Association of Endodontists, 2013).

Tanto la AAE (American Association of endodontists) y American Board of Endodontics aceptaron los términos concluyentes de este encuentro, recomendando el uso de los mismos por parte de los docentes, los estudiantes, especialistas, dentistas generales y profesionales de todas las ramas en la odontología.

Los términos de American Association of Endodontists, 2013, se definieron de manera clínica y radiográfica, tomando en cuenta que las enfermedades de la pulpa y el tejido periapicales son dinámicas y progresivas. Los signos y síntomas variaran dependiendo de la etapa en la que se encuentre y del estado de información necesaria para determinar un probable diagnóstico endodóntico del paciente.

Para el diagnóstico endodóntico se tomaron en cuenta varios procedimientos de examinación reuniendo de manera sistemáticamente toda la información necesaria para determinar un probable diagnóstico endodóntico según la American Association of Endodontists, 2013.

Figura 3. Procedimientos de Examen Requeridos para Realizar Diagnóstico Endodóntico

Historial Médico/Dental	Tratamiento Pasado / Reciente, Drogas
Queja principal (si la hay)	Cuánto tiempo, síntomas, duración del dolor, ubicación, inicio, estímulos, alivio, referido, medicamentos.
Examen clínico	Seno de simetría facial, tracto, tejido sano, estado periodontal (sondaje, movilidad), caries, restauraciones (recién colocadas?).

Pruebas clínicas: Pruebas de pulpa Pruebas periapicales	Frío, prueba de pulpa eléctrica, calor. Percusión, palpación
Análisis radiográfico	Nueva tomografía computarizada de haz cónico periapical (al menos 2)
Exámenes adicionales	Transiluminación, anestesia selectiva, cavidad de prueba.

Fuente: American Association of Endodontists, 2013.

2.1.4.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PULPAR APROBADO POR LA AAE Y ABE

2.1.4.1.- PULPITIS REVERSIBLE

Las piezas dentales que presentan una pulpa irritada, con una reacción incomoda a los estímulos, como al frío o dulces, que se revierte rápidamente se la considera como una pulpitis irreversible. Este diagnóstico se basa en hallazgos subjetivos y objetivos que indican que la irritación pulpar debe resolverse rápidamente pasado el estímulo. (Association of Endodontists, 2013).

La etiología típica de este estado pulpar incluyen exposición dentinaria ya sea por factores mecánicos, químicos o biológicos, tratamientos dentales recientes y restauraciones defectuosas.

Radiográficamente la pieza en cuestión no presenta cambios significativos, a la percusión vertical no presenta respuesta dolorosa. (American Association of Endodontists, 2013). La eliminación conservadora del irritante ya sea la remoción del tejido carioso y sellado del tejido dentinario, cambio de la restauración defectuosa, etc. Deberán dar lugar al cese de la sintomatología pulpar.

Debemos tener en cuenta que existen situaciones en las que el tejido dentinario se encuentra expuesto presentado un dolor agudo, fugaz, que se retira al retirar el estímulo térmico, de evaporación, táctiles, mecánicos, osmóticos o químicos según American Association of Endodontists, 2013.

Como es el caso de la sensibilidad dentinaria presentada comúnmente en los cuellos cervicales con tejido dentinario expuesto. Un interrogatorio detallado de tratamientos recientes, una exploración clínica y radiográfica detallada nos ayudara a distinguir una hipersensibilidad dentinaria de otras patologías dentales, ya que las modalidades terapéuticas para cada una de ellas son diferentes.

2.1.4.2.- PULPITIS IRREVERSIBLE

Dentro de esta categoría existe una subdivisión, las piezas que se clasifican como pulpitis irreversibles precisan un tratamiento pulpar ya que como su nombre indica el daño causado en la pulpa ya es irreversible. (Association of Endodontists, 2013).

2.1.4.2.1.- PULPITIS IRREVERSIBLE SINTOMÁTICA

Esta patología se basa en hallazgos subjetivos y objetivos, que nos llevan a determinar que la pulpa de la pieza en cuestión se encuentra inflamada de manera irreversible. Dentro de la sintomatología este diagnóstico se caracteriza por la presencia de dolor intermitente o espontaneo, el dolor térmico provocado es de carácter agudo o sordo y persiste retirado el estímulo (a lo menos 30 seg.) (Hargreaves K, Cohen S., 2011, American Association of Endodontists, 2013).

Este dolor puede ser localizado o referido, inicialmente no presentara cambios radiográficos significativos, pero a medida de su progreso presentara ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal, presencia de calcificaciones en cámara pulpar y conductos radiculares.

En los antecedentes de este diagnóstico podemos encontrar obturaciones profundas, caries, exposición pulpar o cualquier agresión pulpar directa o indirecta reciente o antigua.

2.1.4.2.2 PULPITIS IRREVERSIBLE ASINTOMÁTICA

Si hablamos de este diagnóstico la pieza dentaria puede presentar caries profunda, exposición por trauma, hasta incluso comunicación pulpar detectada clínicamente o radiográficamente, pero no dará lugar a sintomatología. La pulpa está inflamada pero vital, sin condiciones de reparación. El tejido pulpar reacciona normalmente a las pruebas térmicas y la progresión de este diagnóstico lleva a un inicio de sintomatología o a una necrosis pulpar. (Hargreaves K, Cohen S., 2011, y American Association of Endodontists, 2013).

2.1.4.3 NECROSIS PULPAR

Este estado pulpar indica la ausencia de vitalidad de la pulpa es decir la falta de irrigación de vasos sanguíneos y ausencia del funcionamiento nervioso. Este es el único diagnóstico que intenta describir un estado histológico y le precede a una pulpitis irreversible sintomática o asintomática.

La necrosis total no presentará sintomatología a menos que la infección se haya extendido a otros tejidos, en caso de ser una necrosis aséptica (libre de infección) no causaría sintomatología periapical. Con respecto a las pruebas de vitalidad pulpar, la pieza en cuestión no responde, pero debemos realizar un diagnóstico diferenciado ya que algunas piezas que tuvieron traumas recientemente pueden no presentar respuesta a las pruebas de vitalidad pulpar (por un periodo post trauma) o en piezas dentarias con la cámara pulpar calcificada. (American Association of Endodontists, 2013).

La necrosis puede ser parcial o total puede implicar uno o varios conductos por lo que las pruebas de vitalidad pulpar suele ser confusas, hasta incluso en ocasiones puede presentar sintomatología de una pulpitis irreversible. En una necrosis infectada las bacterias pueden seguir creciendo y se expande hacia el espacio del ligamento periodontal por lo que en ocasiones el movimiento de gases y otros subproductos bacterianos pueden producir sintomatología espontánea, al calor (que calma con el frío) y/o a la percusión vertical. (Association of Endodontists, 2013). Radiográficamente se puede apreciar un engrosamiento del espacio del ligamento periodontal hasta una lesión radiolúcida periapical. (Hargreaves K, Cohen S, 2011).

2.1.4.4 PREVIAMENTE TRATADA

La pieza dentaria con este diagnóstico como su nombre lo indica se caracteriza por haber recibido un tratamiento pulpar previo y que presenta material de relleno en el sistema de conductos radiculares. Generalmente no responden a las pruebas de vitalidad pulpar, pero requiere un tratamiento endodóntico no quirúrgico o quirúrgico para preservar la pieza en boca. (American Association of Endodontists, 2013).

2.1.4.5 TRATAMIENTO INICIADO PREVIAMENTE

Este diagnóstico está dirigido a tratamientos pulpares incompletos o iniciados con anterioridad como es el caso de una pulpotomía parcial iniciada generalmente por una emergencia de una pulpitis irreversible sintomática o asintomática.

La Pieza dentaria con diagnóstico de tratamiento iniciado previamente, puede o no responder a las pruebas de vitalidad pulpar. American Association of Endodontists, 2013. En otros casos los procedimientos se pudieron realizar por traumatismos, pulpa vital, apicoformación, apexogenesis, por lo que no se podrá determinar las características del estado pulpar antes de iniciado el tratamiento previo. (Hargreaves K, Cohen S, 2011).

2.2 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD APICAL APROBADO POR LA AAE Y ABE

2.2.1 TEJIDOS APICALES NORMAL

Las piezas dentales que presenten los tejidos apicales normales se caracterizarán por no presentar sintomatología dolorosa a las pruebas de percusión y palpación. Radiográficamente la lámina dura ósea alrededor del ápice radicular está intacta y el espacio del ligamento periodontal se encuentra uniforme. (Hargreaves K, Cohen S., 2011, American Association of Endodontists, 2013).

2.2.2. - PERIODONTITIS APICAL SINTOMÁTICA

La periodontitis periapical sintomática se caracteriza por presentar sintomatología dolorosa a las pruebas de percusión, palpación o al momento de la masticación. Dependiendo de la etapa de la degeneración pulpar las pruebas de vitalidad pulpar serán variables y se podrán ver cambios radiográficos como un ensanchamiento del espacio periapical o una radiolucidez periapical. (Hargreaves K, Cohen S., 2011, American Association of Endodontists, 2013).

2.2.3. - PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA

En este caso el ligamento periodontal por la inflamación proveniente de la pulpa dental se degenera y sufre destrucción celular. Generalmente no presentará sintomatología clínica, no responderá a las pruebas de vitalidad pulpar, ni a la percusión o palpación. Pero el paciente puede mostrarlo como una sensación diferente que los otros dientes a la percusión. Radiográficamente existirá radiolucidez peri radicular. (Hargreaves K, Cohen S, 2011, American Association of Endodontists, 2013).

Figura 4. Periodontitis Apical Asintomática



Fuente: American Association of Endodontists, 2013.

2.2.4 ABSCESO APICAL AGUDO

Proveniente de una reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis, es de inicio rápido, hay formación de pus causando presión en los tejidos asociados. Se caracteriza por dolor agudo a la presión; a la palpación y percusión, a las pruebas de vitalidad pulpar será negativa, presenta un cierto grado de movilidad. Radiográficamente en algunos casos se observa ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal. A nivel de la mucosa bucal en el fondo del carrillo existe cierto grado de tumefacción ocasionando a menudo al paciente malestar, fiebre y linfadenopatías. (Cohen y Col. 2011).

2.2.5 ABSCESO APICAL CRONICO

Proviene de una reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis, es de inicio gradual, puede presentar poca o ninguna molestia, a las pruebas de vitalidad es negativa, presenta un tracto sinusal por donde descarga material purulento. Radiográficamente hay destrucción ósea dando una imagen radiolúcida. Para identificar la fuente del tracto sinusal se coloca un cono de gutapercha se introduce hasta que se detenga y se toma una radiografía.

2.3 PARTICIPACIÓN DE LOS HONGOS EN CAVIDAD ORAL

Los hongos pueden causar enfermedad en pacientes inmunodeprimidos encontrándose en un 90%, en la cavidad bucal pueden estar en un 25% en el dorso de la lengua principalmente y secundariamente en la mucosa supragingival en la dentina, la raíz dental, mucosa subgingival y en la saliva se encontró el 32,7%.

Los sitios más comunes se encontraron en la placa dental y caries dental. Pero tienen más afinidad con la dentina utilizada como su fuente de nutrición en periodos largos dándole la capacidad de interactuar con otros microorganismos para formar biofilm.

Otro sitio común encontrado fue en las bolsas periodontales. El 50% de estas microbiotas se encontraron en pacientes hospitalizados, dándonos a entender que son microorganismos oportunistas.

2.3.1 PARTICIPACIÓN DE LA *CANDIDA ALBICANS* EN LAS PERIODONTITIS PERIAPICAL ASINTOMÁTICA PRIMARIA

La pulpa inicialmente se encuentra en un estado estéril, una vez que las barreras naturales y fisiológicas pierden su integridad, el complejo dentino pulpar se encuentra expuesto al entorno de la cavidad oral donde los microorganismos que habitan en este medio bañan la superficie dental en una biopelícula, mediante la cual los microorganismos tienen acceso a la cavidad cariosa y posterior contaminando el tejido pulpar.

Los hongos presentes en las periodontitis periapical primaria pueden haber producido la necrosis pulpar o haber entrado luego de la necrosis.

Las microbiotas van formando biopelículas mientras van ingresando a la pulpa hasta llegar a adherirse a esta, se enfrentan a la pulpa, se da lugar a una inflamación

intensa y la pulpa es derrotada, por lo que sigue avanzando en territorio pulpar y colonizándose en el tejido y lo van necrosando, llegan al espacio perirradicular para también colonizarlo, hasta este momento son especies pioneras.

Una de las vías más comunes de los microorganismos para entrar a la pulpa es probablemente por los túbulos dentinarios abiertos, también la caries pudo ser la principal fuente de ingreso del hongo del género *Candida* hallada en mayor frecuencia en medios de cultivo selectivos (Agar Sabouraud dextrosa), otra entrada probable hacia el sistema de conductos radicular.

Otra causa de ingreso podría ser por uso de instrumental contaminado durante la preparación biomecánica inicial del conducto radicular.

Otro camino común para la contaminación son por la saliva esto ocurre durante la terapia endodóntica inicial, pudo atribuirse por el no uso del aislamiento absoluto, siendo un paso tan primordial y crucial, permitiéndole el ingreso a los microorganismos dentro del sistema radicular a su vez introduciéndose en los túbulos dentinarios imposibilitado que el desinfectante logre ingresar a ellos por su compleja anatomía que tienen el sistema del conducto radicular.

2.3.2 PARTICIPACIÓN DE LA *CANDIDA ALBICANS* EN LAS PERIODONTITIS PERIAPICAL ASINTOMÁTICA SECUNDARIA

También llamada persistentes, generalmente debido a una persistencia de la misma o a la eliminación incompleta de los microorganismos del sistema del conducto radicular ocurrido durante la terapia inicial. La *Candida albicans* han estado presentes con más frecuencia en tratamientos endodónticamente tratados, se las encontró asociados con bacterias gram-positivos anaerobias.

Para que el tratamiento resulte fallido después de la terapia endodóntica encontraron una variedad de factores entre ellos tenemos. (Gusman H. y Cols., 2015):

- La resistencia de los microorganismos al tratamiento del conducto radicular.
- La resistencia a la medicación intraconducto habitualmente usados.
- La variada complejidad que puede tener el conducto radicular, entre estos tenemos los conductos accesorios, deltas apicales, conductos atresicos y conductos no encontrados etc., creando un obstáculo para una limpieza adecuada.
- La invasión profunda de los microorganismos en los túbulos dentinarios, debido a su fácil adaptación a cualquier medio y sobrevivir dentro los conductos radiculares.
- La formación de biofilm en el interior del conducto radicular forman microcolonias de contenido bacteriano y hongos, pudo ocurrir la contaminación en algún momento del tratamiento endodóntico inicial. Por tanto los estudios recientes reportan la importancia de este biofilm presentes en el interior de los conductos porque le dan protección a los microorganismos ante los cambios ambientales adversos que puedan encontrarse.
- Un mal diseño de la cavidad de acceso, posiblemente retengan residuos de tejido pulpar.
- Fuga de restauraciones temporales o permanentes, hacen que ingresen al interior del canal radicular. (Vytaute P. y Cols., 2008).
- Otro de los factores influyentes para los fallidos endodónticos fue el tamaño de la lesión periapical encontrado y el tiempo de la obturación después de la lesión. (Estrela C. y Cols., 2014).

El estudio de Fabbro y Cols. Recomiendan seguimiento en casos de retratamientos por lo menos cuatro años después de haber concluido la endodoncia. (Vytaute P. y Cols., 2008).

2.4 CANDIDA ALBICANS

2.4.1 TAXONOMÍA

Candida albicans corresponde al Reino Fungi o Mycetae.

Se coloca en los Deuteromicetos dentro de la familia Cryptococcaceae.

Antes de que la *Candida albicans* reciba este nombre tuvo que pasar por varios sinónimos como el de Robin que en 1853 genero el término de *Oidium albicans* siendo está incluida dentro de sus 100 sinónimos reconocidos actualmente.

En 1890 Zopt denomino a una especie de la *Monilia* como *Monilia albicans*, pero ya en 1923 Berkhout propuso el Genero *Candida* y la especie *albicans*. Esta proposición fue aceptada por el Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York realizada en 1939. A partir de este Congreso la *C. albicans* es conocida de esta manera.

La *C. albicans* es una levadura predominante en su especie, seguida de la *C.glabrata*, *Candida Krusei*, *Candida Tropicalis*, *Candida Guillermondii*, *Candida Kefyr* y *Candida parapsilosis*. (Waltimo T. y Cols., 2004).

Las levaduras orales pertenecen a la división Ascomycota y clase Endomycetes, se dividen en cuatro familias: *Saccharomycetaceae*, *Endomycetaceae*, *Dipodascaceae* y *Lipomycetaceae*. (Waltimo T. y Cols. 2003). Clínicamente las levaduras orales más importantes perteneces a la familia *Saccharomycetaceae* y al género *Candida*.

2.4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA C. ALBICANS

Los hongos son células eucariotas pertenecen al reino fungí del genero *Candida*. Crecen en forma de yemas redondas u ovaes de 4 a 6 um., son de variada

morfología durante su crecimiento por tanto evaden la acción letal de los sistemas de irrigación y medicación intraconducto empleados durante la terapia endodóntica, proporcionan habilidad para penetrar a los túbulos dentinarios a través de su adherencia de las hifas y pseudohifas y son capaces de unirse a los colágenos I y IV mejorándole su adhesión dental y tienen la capacidad de producir aspartil proteasas secretadas, colegenasas, hialuronidasa ácidos y fosfatasa, degradan a esta variedad de colágenos.

Las hifas y pseudohifas le dan crecimiento filamentosos dándole la cualidad de presentarse en diversas formas y poder adaptarse a diferentes condiciones y ambientes en los tejidos.

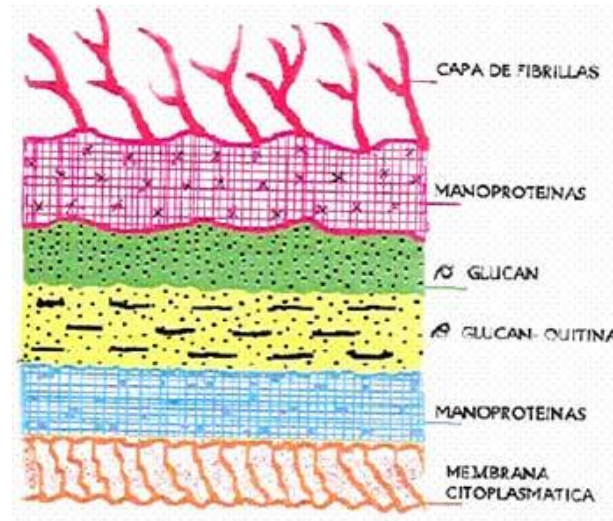
Las hifas son esenciales para invadir los tejidos ya que en su punta secretan enzimas la fosfolipasas los cuales degradan los componentes celulares del huésped y penetran las barreras tisulares.

Es de crecimiento lento antes de iniciar la terapia de endodoncia y sobreviven en condiciones anaerobias a pesar de ser aerobias y se adaptan a un Ph alto, también sobre viven con un bajo contenido de oxígeno y nutrientes, Department of Conservative Dentistry and Endodontics, 2013. La composición química de la *C. albicans* representada por el 20% a 40% de proteína y de 30% a 50% de polisacáridos, en cambio la proporción de lípidos es variada dependiendo de la cepa y su edad del cultivo y las condiciones ambientales.

La pared celular de la *C. albicans* tiene un espesor variable, compuesta por varias capas, el número y su morfología varían, esta variación se debe a la etapa de crecimiento celular en la que se encuentre, la forma de crecimiento ya sea como levadura o como tubo germinal.

La mayoría de los investigadores describen cinco capas dentro de la pared celular son de adentro hacia afuera: Manoproteínas, B-Glucán-Quitina, B-Glucan, Manoproteínas y una capa de fibrillas. (Pardi Germán, 2002).

Figura 5. Esquema de la Pared Celular de *C. Albicans*



Fuente: Microbiología Oral

Al ser una célula eucariota, contienen núcleo, nucléolo y delimitado por la membrana nuclear, con varios cromosomas y orgánulos citoplasmáticos como mitocondrias, vacuolas, aparato de Golgi y ribosomas.

Su pared celular con una estructura multilaminar compuesta por polisacáridos y diversas proteínas, responsable de protección frente a los cambios osmóticos que pueda tener el medio de crecimiento. (Alvear J. Cols., 2012).

2.4.3 IMPLICANCIA DE LA *CANDIDA ALBICANS* EN ENDODONCIA

Desde 1894 Miuller es quien dio a conocer por primera vez la presencia de los microorganismos en conductos radiculares infectados, pero no fueron verificados al

no contar con tecnología adecuada, con el tiempo y en la actualidad aparecieron técnicas de identificación, como los métodos de cultivo, métodos de dilución y el más innovador el método molecular de PCR han sido fáciles y rápidos para la identificación microbiana y detectar la contaminación de la muestra. (Vytaute P. y Cols., 2008).

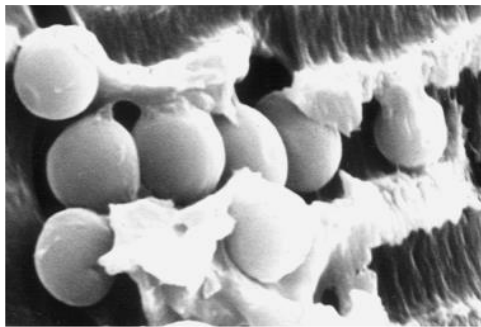
En 1998 mostraron dos estudios microbiológicos de la flora del conducto radicular en el tratamiento primario, es más fácil debido a que se encontraron gran cantidad de células bacterianas y especies de gram-positivas y gram-negativas, mientras que en casos de retratamiento fueron difíciles debido a la reducción de las células microbianas encontradas, después de una preparación biomecánica del conducto. La diferencia se debieron a los cambios de temperatura, el Ph y nutrientes esenciales en el conducto radicular antes y durante los procedimientos del tratamiento del conducto.

En muchos estudios actuales mostraron que los microorganismos son los principales causantes de las enfermedades pulpares y periapicales, también se asocian a los fracasos de tratamientos endodonticos, pero hay otros factores que pueden contribuir al fracaso, como la presencia de las levaduras encontradas entre un 7% a 17%, Department of Conservative Dentistry and Endodontics, 2013, del genero *Candida* aislado con más frecuencia la *Candida albicans* entre el 7% al 55% encontrado en el interior de los conductos radiculares. (Romero D. y Cols., 2013).

Vytaute P. y Cols., 2008, manifiestan que la *Candida albicans* es la más común y la más resistente a los procedimientos endodonticos, tienen la capacidad de colonizar las paredes del canal radicular e invadir los túbulos dentinarios. Las habilidades de este hongo para resistir a muchos de los agentes irrigadores empleados y poder adaptarse a medios extremos, como no contar con medios nutrientes también forman biopelículas, etc.

Nos lleva a estudiarla más a fondo ya que sería una razón por la cual nuestros tratamientos resultan fallidos. Por tanto es importante conocer el papel y la frecuencia de las levaduras en las infecciones persistentes a la terapia del conducto radicular. (Waltimo T. y Cols., 2003, Saad Al-Nazhan y Cols., 2014).

Figura 6. Candida albicans adhiriéndose e invadiendo en un túbulo dentinario



Fuente: Clinical aspects related to endodontic yeast infections.

2.4.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE LA CANDIDA ALBICANS EN EL CONDUCTO DENTARIO

La *C. albicans* al ser un patógeno oportunista por excelencia presenta factores de virulencia que no son muy poderosos pero en algunos casos pueden tornarse resistentes y agresivos, algunos de sus factores conocidos son. (Silva H. y Cols., 2011 y Ryan K. y Cols., 2011):

- Al medir de 4 a 6 μm . y tener diferentes tamaños durante su crecimiento dándole la capacidad de invadir, ingresan en diferentes estructuras como en los túbulos dentinarios.
- Presentan hifas y pseudohifas como factores de adherencia, éstas le dan la cualidad de tener cambio en su morfología y además poder adaptarse a diferentes condiciones ambientales de crecimiento. Sus mecanismos de

adherencia son: interacción entre receptores y ligando, fuerzas electrostáticas y la agregación.

- Las hifas son esenciales para penetrar los tejidos ya que en su punta secretan enzimas la fosfolipasas los cuales degradan los componentes celulares del huésped y penetran las barreras tisulares, colonizando e invadiendo el área. (Galárraga M., 2014).
- La *Candida albicans* tiene la facultad de poder coagregarse con bacterias como las *Streptococcus* y *Actinomyces* entre otras.
- Otra característica importante es de formar biofilm en diversos tipos de superficies y coagregarse con las bacterias lo cual le hace resistir a la anfotericina B e incrementando su patogenicidad.
- Pueden evadir o estimular el mecanismo de defensa del huésped ante las infecciones.
- Secretan proteinasas SAP (Secreted Aspartic Protease), las cuales digieren moléculas y células de defensa del huésped alterando la fagocitosis y otros mecanismos de defensa. Estas proteinasas degradan: hemoglobina, queratina e inmunoglobulinas.

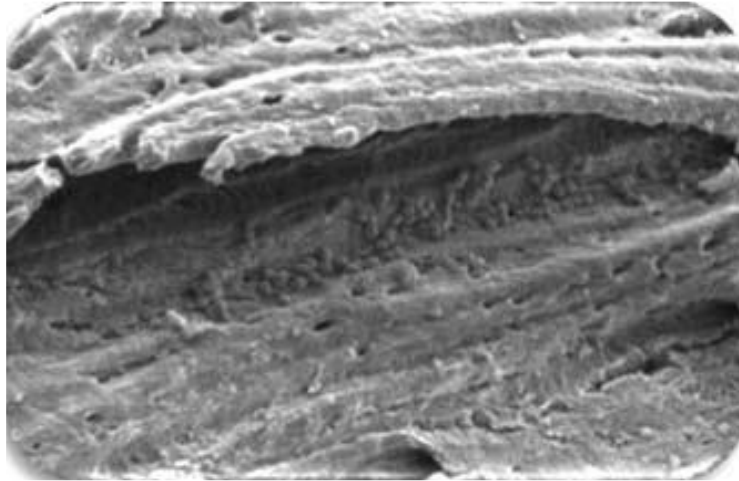
2.4.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA *CANDIDA ALBICANS* EN EL TEJIDO DENTINARIO

La pulpa y la dentina están relacionados íntimamente, la dentina al quedar expuesta al medio bucal a causa de caries extensas o por restauraciones defectuosas, o en casos de fisuras del esmalte o dentina o por casos más serios como traumas dentales etc., ocasionan contaminación por microorganismos en el complejo pulpo-dentinario, causando enfermedad en el conducto radicular. (Silva-Herzog D., García C., 2011).

Al quedar expuesta la dentina la *C. albicans* al ser patógenos además oportunistas llega a invadir los túbulos dentinarios, al ser la dentina como su fuente de nutrición primordial por su composición de tejido conectivo mineralizado, compuesto de

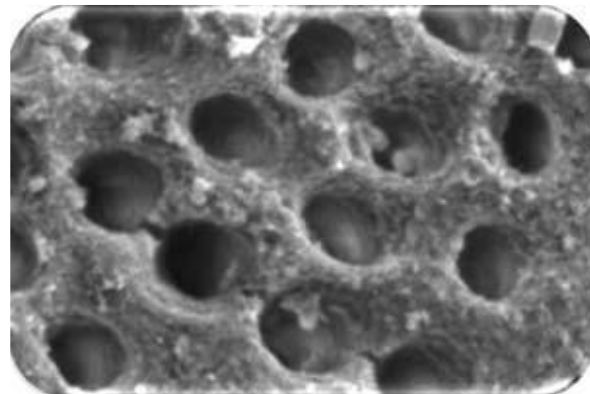
hidroxiapatita, y rico en proteínas y además de ser dura y porosa. (Silva-Herzog D., García C., 2011).

Figura 7. Corte transversal donde se observa penetración a túbulos dentinarios en una magnificación de 2000X.



Fuente: Invasion of *Candida albicans* and *Enterococcus Faecalis* in Human Dentine

Figura 8. Microfotografías con microscopio electrónico de barrido Corte longitudinal de túbulos dentinarios a una magnificación de 4000X



Fuente: Invasion of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in human dentine.

Los tubulos dentinarios son estructuras cónicas que miden aproximadamente de 2,5 um de diámetro cerca de la pulpa, 1,2 um en la parte media de la dentina y 0,9 um. cerca de la unión dentina-cemento. A diferencia de las bacterias que miden de 0,3 a 0,8 um., más pequeñas que las levaduras permitiéndole invadir más

profundamente la pulpa a través de los túbulos dentinarios. Existe entonces la posibilidad de que los microorganismos estén protegidos ante los desinfectantes empleados durante la terapia endodóntica. (Department of Conservative Dentistry and Endodontics, 2013, y Saad Al-Nazhan y Cols. 2014).

A su vez el túbulo dentinario también contiene fluido y dentro están las proteínas como albumina, Ig G y otras proteínas, todo este complejo funcionan como su fuente de nutrición además de adherirse hacia las paredes del túbulo dentinario. (Silva-Herzog D, García C., 2011).

El estudio realizado por Silva-Herzog D., 2011, tomaron tres grupos experimentales para ver la capacidad de penetrar al interior de los túbulos dentinarios:

- Primer grupo de cinco días, la inoculación mostro la penetración a los tubulos dentinarios en poca cantidad y profundidad, y la forma de la *C. albicans* fue de levaduriforme.
- Segundo grupo de diez días, la inoculación ha mostrado una mayor invasión hacia los túbulos tanto en cantidad como en profundidad, la *C. albicans* con forma de levaduriforme y de hifas.
- Tercer grupo de quince días, se observó una gran cantidad de *C. albicans* como hifas en forma de red presentando colonias densas.

De acuerdo a estos experimentos determinaron que el tiempo de exposición eran cruciales, la diferencia pudo ser atribuido por el tamaño de la *C. albicans* y por su morfología, (Siqueira, 2002) atribuye también a las condiciones del ambiente para una fase filamentosa.

Otra causa para atribuir a este estudio fue la presencia del barrillo dentinario, desechos que se forman durante la preparación biomecánica en el interior del conducto dentario y favorecen su crecimiento de la levadura.

2.4.6 BIOPELÍCULAS Y LA *CANDIDA ALBICANS*

Uno de los mayores avances de la microbiología ha sido el estudio y el conocimiento sobre el desarrollo de las agrupaciones de los microorganismos formando biopelículas o biofilm. Sirvent F. y Col., 2010.

El biofilm se puede definir como una sociedad o comunidades a un conjunto de varios tipos de microorganismos, caracterizados por solo requerir un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, para desarrollarse. Según Figdor, mostraron que la periodontitis periapical asintomática es posiblemente una de las formas más comunes de biofilm inducidas y que afectan a los seres humanos.

En los últimos años se ampliaron los estudios relacionados con el biofilm ya que se vio una gran participación como un factor patógeno en infecciones de diferentes órganos y sistemas como en el urinario y hasta en los conductos radiculares dentinarios. Pudiendo tornar a las infecciones persistentes ante varios agentes de eliminación de los mismos.

2.4.6.1 MORFOLOGÍA DEL BIOFILM

Al microscopio presentan una variada morfología desde pequeñas formaciones hasta cadenas de biofilm, pero la forma más característica encontrada fue la de champiñón, se encuentran separadas de otras por canales de agua todo dentro de la matriz de polisacárido. Se cree que estos canales permiten la distribución de los nutrientes y al mismo tiempo la eliminación de los residuos de las colonias, así como la atenuación de los agentes biosidas externos es decir los antibióticos, irrigantes y la medicación intraconductos empleados durante la terapia endodóntica. Este tipo de organización de las microbiotas se observaron en biofilm de larga evolución y no así en colonias jóvenes e inmaduras. (Sirvent F, Garcia E., 2010).

2.4.6.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM

La formación del biofilm tiene cuatro fases y fue descrito por Svensâter y Bergenholtz S. y Col., 2010:

- Primera fase. Formación de una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos que son derivados de los microorganismos en suspensión, es decir de tejidos necróticos y procesos inflamatorios.
- Segunda fase. Sobre esta película pegajosa se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión, de todas las que están en suspensión.
- Tercera fase. En la primera capa de estas bacterias ya adheridas, segregan mediadores que por un lado van fijando más y más bacterias, por otro lado también van formando la matriz extracelular de polisacáridos, llegando a formar la primera barrera característica del biofilm.
- Cuarta fase. El biofilm va madurando y creando sistemas de defensa más complejos, también arrojan bacterias a su exterior que cronifican la respuesta inflamatoria del huésped.

Se dice que la evolución del biofilm es un misterio, es decir no se conocen los mecanismos por los cuales las bacterias se asocian en biofilm. La madures del biofilm es directamente proporcional a su capacidad de defensa y además a su resistencia a ser eliminado, en tanto que la desinfección prematura es primordial. (Svensâter y Bergenholtz S. y Col., 2010).

2.4.6.3 MECANISMO DE DEFENSA DEL BIOFILM

El biofilm cuenta con una gran capacidad de resistencia debido a la complejidad anatómica que presenta el conducto radicular, por las zonas de difícil acceso para los agentes desinfectantes. Al contar con matriz de polisacáridos actúan como una

barrera física y química ante agentes externos, cambios de ph etc. Manteniendo un ambiente interior adecuado para la supervivencia, aislándolo del exterior, pero también tienen comunicación interna aprovechan el intercambio de material genético entre las microbiotas, aumentan su capacidad de defensa del biofilm. Las enzimas producidas por el biofilm promueven la adhesión a otros sustratos o a otros tipos de bacterias y también actúan inactivando agentes químicos antiinfecciosos.

El crecimiento en forma de biofilm es la principal forma de vida de las microbiotas y facilita su supervivencia en la mayoría de las condiciones ambientales, es por lo tanto que las levaduras han sido encontradas con más frecuencia en los canales radiculares infectados. (Sirvent F. y Col., 2010).

2.5 TECNICAS DE LA REACCION DE CADENA DE LA POLIMERASA MOLECULAR Y ANALISIS MICROBIOLOGICO

2.5.1 EXTRACCION DE DNA, TRATAMIENTO PRE- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para poder extraer el ADN celular deberá ser de sumo cuidado ya que podría perderse o contaminarse en el proceso. Para este proceso existen muchas técnicas pero dependerá del tipo de estructura a la que queremos atravesar para extraer el ácido nucleico ADN tan preciado y deberá estar en un estado puro para su análisis respectivo. Por tanto existen etapas que se deben seguir.

Las etapas para su preparación según Perera J. y Cols., 2002:

- Lisis
- Separación
- Purificación

Lisis. El objetivo de este paso es de poder atravesar la barrera que protegen a los ácidos nucleicos, son moléculas que se encuentran en estructuras y están

organizadas, por lo que la lisis rompe estas estructuras estas pueden ser membranas o capsulas, su propósito es de acceder a los ácidos nucleicos.

Esta lisis tiene diferentes métodos y se clasifican en. Pereira J. y Cols., 2002:

a) Físicos

Aquí se realiza la ruptura directamente por medio de una manera física por diferentes técnicas tenemos:

- Abrasión, se realiza en un montero en el cual se macera el tejido o células mezcladas con bolsas de vidrio, alumina o arena.
- Compresión, con los sistemas de compresión y descompresión en prensas.
- Sonicación, por medio del ultrasonido.
- Cizallamiento, con homogenizadores de émbolo.
- Congelación y descongelación, colocando a las células en ciclos sucesivos de congelación y descongelación.
- Choque osmótico, se realiza mediante suspensión en medios hipotónicos.

b) Químicos

Este método rompe las interacciones moleculares que mantienen a la membrana, mediante técnicas químicas.

c) Enzimáticos

El método degrada compuestos específicos de las membranas y paredes celulares. Separación. Posteriormente de causar la ruptura de las estructuras en la fase de lisis, se va a presentar la molécula en una solución mezclada con otros tipos de moléculas variadas. La segunda fase del proceso el cual la más complicada ya que se debe separar aislar y purificar el material genético. Consiste en fraccionar la

mezcla que se menciona es decir el aislamiento. En esta etapa se aplican técnicas de bioquímica para la separación y purificación, al ser los ácidos nucleicos de mayor tamaño que las otras moléculas, además de hidrofílicos y de naturaleza ácida, las técnicas aprovechan estas características para separar a los ácidos nucleicos del resto de los componentes de la mezcla.

Se sabe que el estado natural los ácidos nucleicos se asocian a proteínas básicas lo cual hace que estas macromoléculas sean contaminantes naturales de los ácidos nucleicos. (Perera J. y Cols., 2002).

Entre las técnicas de bioquímica que más se utilizan para el proceso de separación tenemos, Perera J. y Cols., 2002:

- La sedimentación especialmente en gradientes de sales de cesio, la cual permite separar moléculas de proteínas, el RNA, DNA circular plasmático y el DNA lineal cromosómico.
- La cromatografía la cual retiene moléculas en doble hélice.
- La electroforesis en gel agarosa o de poliacrilamida que permite separar moléculas de ácidos nucleicos por medio de su capacidad de desplazarse en una red de gel. La capacidad de moverse electroforéticamente depende de varios factores, entre ellos están las características propias de las moléculas como la forma de los ácidos nucleicos y su tamaño.
- La diálisis a través de membranas que elimina pequeñas moléculas como sales presentes en la disolución del ácido nucleico.
- Extracción con disolventes orgánicos por medio de fenol, el cual extrae las proteínas presentes en la disolución de ácidos nucleicos.
- La precipitación de ácidos nucleicos con alcoholes.
- La digestión enzimática la cual elimina las proteínas unidas a los ácidos nucleicos las cuales son los contaminantes universales.

2.5.2 AMPLIFICACION DE SECUENCIAS DE ADN, REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction, es una técnica de biología molecular descrita por Kary Mullis en los años 1986, ha cambiado el mundo de la biología molecular.

El fin es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, es decir es utilizada para replicar la mayor cantidad de veces en un segmento pequeño de ADN particular, logrando identificar con alto porcentaje de fiabilidad a quien corresponda dicho ADN. Para lograr la replicación de las hebras de ADN se utilizan temperaturas altas y bajas, calentando y enfriando la mezcla, para lograr el cometido se emplea el termociclador el cual esta automatizado. (Tamay L. y Cols., 2013).

Gracias a esta técnica se resolvieron uno de los principales problemas en el campo molecular el cual era aislar secuencias puras de ADN del genoma. El PCR logra la amplificación de una secuencia determinada de ADN, con el cual se produce muchas copias de la misma secuencia. (Perera J. y Cols., 2002).

La técnica de PCR se realiza in vitro tomando secuencias exactas de ADN para su posterior amplificación, consta de tres fases. (Perera J. y Cols., 2002):

- Desnaturalización de ADN molde, se separan las dos hebras de ADN, se realiza sometiéndole al fragmento de ADN contenido en la disolución a altas temperaturas, se coloca el recipiente de reacción a 94° Celsius, puede ser un minuto dependiendo de la longitud de la cadena
- Hibridación de cebadores que se logra bajando la temperatura a 50° Celsius por dos minutos para producir la unión de cebadores o primers a las zonas complementarias del ADN que fueran desnaturalizadas previamente. Un cebador es un oligonucleótido es una copia fiel de una secuencia corta de las dos hebras de ADN, ubicada en los extremos de la región escogida para

amplificar. Los cebadores se unen a su secuencia complementaria en el ADN produciendo una estructura monocatenaria cebada que es el sustrato de las polimerasas.

- Elongación, ocurre cuando se pone a la disolución a una temperatura de 72° Celsius por tres minutos. A la presencia de los DNPTS, la polimerasa elonga el sustrato cebado y repitiendo por varios ciclos hasta obtener la amplificación del fragmento de ADN cuyos extremos corresponden a los terminales 5' de los cebadores utilizados, cuya longitud está definida por la posición de estos en la secuencia del ADN original. (Perera J. y Cols., 2002).

2.5.3 ELECTROFORESIS

En el proceso de la electroforesis se realizará la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular en una matriz de poliacrilamida usando un campo eléctrico, ver anexo 8. Se analizara dicha distribución y en tanto dependerá de la concentración del gel de resolución con el que se hubiera trabajado. (Yábar C., 2003).

El genoma y secuencia genética son fundamentales para poder reconocer desde la familia, el tipo y cepa a la que pertenecen ciertos microorganismos. El reconocimiento de los mismos se puede dar por medio de la identificación de su ADN o de fragmentos del mismo los cuales se forman cuando las enzimas de restricción son específicas. Atacan a la molécula de ADN y consecuentemente ocurre la escisión del ADN generando longitudes diferentes por la acción de las endonucleasas de restricción. El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción es el resultado de las diferencias en la longitud de fragmentos de ADN entre las diferentes cepas de un microorganismo específico producidas por la restricción con una o más endonucleasas. (Murray P. y Cols., 2009).

Como resultado de lo anteriormente mencionado, el ADN presenta diversos tamaños en sus estructuras las cuales se pueden identificar de acuerdo a su

movilidad electroforética en un gel conformado por agarosa. La electroforesis se basa en el movimiento de las macromoléculas disueltas en un determinado medio, a través de una matriz y como resultado de la acción de un campo eléctrico. (Perera J. y Cols., 2002).

Es decir que las diferentes formas de la misma secuencia de ADN y las diferentes longitudes de ADN se mueven a través de una estructura laberíntica de un gel de agarosa a diferentes velocidades, lo que permite su separación. Murray P., y Col., 2009.

Es importante recalcar que el movimiento electroforético depende del tamaño, carga y forma de la molécula, por lo que dos moléculas que presentan diferente movilidad pueden ser separadas, identificadas, caracterizadas y cuantificadas por medio de la comparación con los controles respectivos.

Al ocurrir este movimiento del ADN a través del gel, se puede ver las bandas de ADN por la tinción dada por el bromuro de itidio. Los fragmentos de ADN de menos de 20.000 pares de bases que por lo general son los plásmidos bacterianos o virus son los que se pueden separar y visualizar por medio de este método electroforético. (Murray P., y Col., 2009).

2.5.4 DETECCIÓN DE ADN PERTENECIENTE A CELULAS MUERTAS O VIABLES POR TECNICAS MOLECULARES.

Las técnicas moleculares actuales como la reacción en cadena de la polimerasa son capaces de identificar tanto material genético de células vivas como muertas de los microorganismos presentes en los tejidos enfermos, lo cual puede ser considerado una ventaja y desventaja a la vez. En cuanto a la ventaja de reconocer ADN que proviene de células muertas, es de gran utilidad cuando las bacterias recolectadas en la muestra han sido afectadas por la transportación, aislamiento y

manipulación con lo cual a pesar de morir en este proceso son reconocidas por medio del análisis de su ADN.

No obstante reconocer ADN de células muertas en el tejido enfermo puede sugerir de manera falsa que la presencia bacteriana está involucrada en la fisiopatología de la enfermedad y no necesariamente ser así ya que las bacterias identificadas ya están muertas.

A pesar de lo mencionado anteriormente el hecho de encontrar la presencia de ciertas especies en los tejidos perirradiculares, es de gran importancia clínica ya que da un parámetro para seguir en cuanto al tratamiento tanto clínico como antibiótico que será más eficaz de acuerdo a los microorganismos identificados. (Murray P. y Col., 2009).

CAPITULO III

3.1 RESULTADOS

3.1.1 ANALISIS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

Tabla Nº 4 Distribución de la población en estudio

Población 2016 Diagnóstico – Género			
Diagnóstico	Masculino	Femenino	Total
Periodontitis periapical asintomática primaria	49 %	14%	63%
Periodontitis periapical asintomática secundaria	30%	7%	37%

En la anterior tabla se describe la población atendida con periodontitis periapical asintomática en la clínica de la especialidad de endodoncia en la gestión 2016 en la Facultad de Odontología de la UMSA con respecto al género y diagnóstico.

De la población de estudio de 59 muestras totales se obtuvo los siguientes resultados:

En la periodontitis periapical asintomática primaria en el sexo masculino se obtuvo un 49% (que representa 29 muestras), en el sexo femenino se obtuvo un 14% (que representa 8 muestras), haciendo un total del 63% (que representa 37 muestras).

- En la periodontitis periapical secundaria en el sexo masculino se obtuvo 30% (que representa 18 muestras), en el sexo femenino se obtuvo un 7% (que representa 4 muestras), haciendo un total de 37% (que representa 22 muestras).

Tabla Nº 5. Descripción de la población en estudio

Población Grupo dentario - Género			
Grupo dentario	Femenino	Masculino	Total
Incisivos y Caninos	27%	7%	34%
Premolares	17%	15%	32%
Molares	19%	15%	34%

En la anterior tabla se describe la población atendida con periodontitis periapical asintomática en la clínica de la especialidad de endodoncia en la gestión 2016 en la Facultad de Odontología de la UMSA con respecto al grupo dentario y género, donde un 27% de las muestras en estudio del 2016 fueron del sexo femenino y del grupo dentario de incisivos y caninos.

Tabla Nº 6 Distribución de la población con diagnostico primario

Población- Periodontitis periapical asintomática primaria			
Grupo etáreo y Género			
Edades	Género		Total
	Femenino	Masculino	
12 a 20	11%	19%	30%
21 a 29	13%	9%	21%
30 a 38	6%	15%	21%
39 a 48	2%	11%	13%
Mayores a 49	6%	9%	15%
Total	38%	62%	100%

En la anterior tabla se describe la población en estudio con periodontitis periapical asintomática primaria relacionado con el grupo etáreo y género, donde un 19% de

la población estudiada con periodontitis periapical asintomática primaria está representada por el género masculino comprendido entre los 12 a 20 años.

Tabla Nº 7. Distribución de la población con diagnostico secundario

Población- Periodontitis periapical asintomática secundaria- Grupo etáreo y género			
Edades	Femenino	Masculino	Total
12 a 20	8%		8%
21 a 29	25%		25%
30 a 38	8%	25%	33%
39 a 48	17%		17%
Mayores a 49	8%	8%	17%
Total	67%	33%	100%

En la anterior tabla se describe la distribución de la población en estudio con periodontitis periapical asintomática secundaria de acuerdo al grupo etáreo y género. Un 25% de la población estudiada con periodontitis periapical asintomática secundaria pertenecen al grupo etáreo comprendido entre los 21 a 29 años mujeres y otros 25% de 30 a 38 años en varones.

3.2 RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Tabla N° 8 En la siguiente tabla se muestra la presencia y ausencia de los genes marcadores específicos de 23 S y de *C. albicans* en las 58 muestras sometidas al laboratorio de Biología Molecular para ser procesadas por medio de la PCR

Muestra	LEVADURAS	23S	<i>C. albicans</i>
1	1L	-	-
2	2L	-	-
3	3L	-	-
4	4C	-	-
5	5C	-	-
6	6C	-	-
7	7L	-	-
8	8C	-	-
9	9C	-	-
10	10C	-	-
11	11	-	-
12	12C	-	-
13	13C	-	-
14	14L	-	-
15	15L	-	-
16	16C	-	-
17	17L	+	+
18	18C	-	-
19	19L	-	-
20	20L	-	-
21	21L	+	+
22	22L	+	+
23	23L	-	-
24	24L	+	+
25	25L	-	-
26	26C	-	-
27	27L	-	-
28	28L	-	-
29	29L	-	-
30	30C	-	-
31	31	+	+
32	32	-	-
33	33	-	-
34	34C	-	-
35	35C	-	-
36	36C	-	-
37	37C	-	-
38	38C	-	-
39	39C	-	-
40	40C	-	-
41	41C	-	-
42	42C	-	-
43	43C	-	-
44	44C	-	-
45	45C	-	-
46	46C	-	-
47	47C	-	-
48	48	-	-
49	49	-	-
50	50L	-	-
51	51L	-	-
52	52L	-	-
53	53L	-	-
54	54C	-	-
55	55C	-	-
56	56C	-	-
57	57	-	-
58	58L	-	-

Fuente: Biología Molecular del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímicas de la U.M.S.A.

3.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Tabla N°9 Resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa para *C. albicans* en la población de estudio.

PCR para <i>C. albicans</i> - Resultados		
Resultados	número de pacientes	%
Positivos	5	8%
Negativos	54	92%

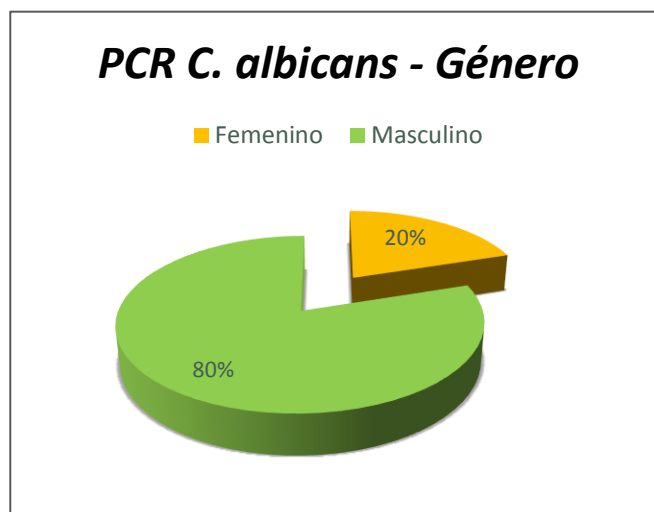
En la anterior tabla se muestra los porcentajes que representan los resultados positivos y negativos de la aplicación de la PCR, para la identificación de *C. albicans* en periodontitis periapical asintomática, donde el 8% de las muestras recolectadas de las piezas dentarias con periodontitis periapical asintomática mostraron ser positivas a la presencia de *C. albicans*

Tabla N° 10 Resultados positivos de la Reacción en cadena de la polimerasa para *C. albicans* de la población en estudio de acuerdo al género.

PCR <i>C. albicans</i> , Positivos, Género		
Género	Número de pacientes	%
Femenino	1	20%
Masculino	4	80%

En la anterior tabla se representa de forma porcentual las muestras positivas con respecto al género, donde el 80% de las muestras en la que destaca *C. albicans* pertenece al género masculino de la población.

Figura N. 9 Representación porcentual de las muestras positivas con respecto al género.



El 80% de las muestras en la que destaca *C. albicans* pertenece al género masculino de la población.

Tabla Nº 11 Resultados positivos de la población de estudio

PCR <i>C. albicans</i> - grupo etáreo		
Edades	Nº de Pacientes	%
12 a 20 años	2	40%
21 a 29 años	2	40%
30 a 38 años	1	20%

En la anterior tabla se muestra la distribución de la presencia de *C. albicans* de la población en estudio de acuerdo al grupo etáreo, donde un 40% pertenecen al grupo etareo de 12 a 20 años y el de 21 a 29 años el otro 40% de las muestras positivas de *C. albicans*.

Tabla Nº 12 Resultados positivos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *C. albicans*.

PCR <i>C. albicans</i> - grupo dentario		
Grupo dentario	Nº de pacientes	%
Incisivos y caninos	2	40%
Premolares	3	60%

En la anterior tabla se muestra la distribución de los resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa para *C. albicans* de la población en estudio de acuerdo al grupo dentario, donde el grupo de premolares es más representativa con el resultado del 60% siendo con la diferencia de los incisivos y caninos con el 40%.

Tabla Nº 13 Resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa para *C. albicans* de la población en estudio.

PCR <i>C. albicans</i>- positivos- Diagnóstico		
Diagnóstico	Nº Pacientes	%
Periodontitis periapical asintomática primaria	3	60%
Periodontitis periapical asintomática secundaria	2	40%

En la anterior tabla se muestra la distribución de los resultados positivos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *C. albicans* de la población en estudio de acuerdo al diagnóstico, donde en la población con periodontitis periapical sintomática primaria resulto el 60% de frecuencia y en la secundaria con el 40%.

Tabla Nº 14 Resultados positivos de la población en estudio

PCR <i>C. albicans</i>, positivos - grupo etáreo - género		
Edades	Género	
	Femenino	Masculino
12 a 20 años		40%
21 a 29 años	20%	20%
30 a 38 años		20%

En la anterior tabla se muestra la distribución de los resultados positivos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *C. albicans* de la población en estudio de acuerdo al Grupo etáreo y género, donde en la población masculina entre las edades de 12 a 20 años presentaron un 40% para la presencia de *C. albicans*.

3.4 DISCUSION

Se ha investigado la presencia de *C. albicans* en las periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria, en los cuales estos resultados de este estudio mostraron que se encuentran por debajo de lo reportado del artículo de referencia que se tomó de Aysin Dumani y Colaboradores.

Se corrobora que estos microorganismos son hongos resistentes en la cavidad bucal a los procedimientos de tratamiento del conducto radicular, como se muestra en estudios realizados de Poptani B. y Colaboradores y Romero Salazar, además de Siqueira y Colaboradores que también indican que encontraron presencia de *C. albicans*.

Sin embargo Waltimo Tuomas indica que no se encontró presencia de levaduras en las muestras en lesiones periapicales, estas levaduras están particularmente

asociados con infecciones persistentes que no responden a una terapia endodóntica común.

3.5 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los estudios realizados se identificaron 59 muestras de las cuales 63% (37 muestras) son de diagnósticos de periodontitis periapical asintomática primaria y 37% (22 muestras) de periodontitis periapical asintomática secundaria.
- En el método molecular o también conocido como PCR, se obtuvieron un gran número de copias de un pequeño fragmento de ADN, logrando identificar con alto porcentaje de fiabilidad.
- Se recolectaron las muestras tanto en hombres como en mujeres en conos absorbentes estériles los cuales se llevaron a laboratorio para su identificación de la *C. albicans*.
- En la toma de muestra se utilizó las puntas de papel donde se introdujeron en tubos de ependorf estériles de 1.5ml, los cuales se mantuvieron en frío (-20°C). Las muestras se llevaron a 37°C por dos horas en horno de secado, se retiraron las muestras y se mantuvieron a temperatura ambiente por 24h luego se llevaron las muestras al laboratorio de biología Molecular del instituto de investigaciones en el cuál se mantuvieron a 4°C, posterior a esto estas muestras quedan listas para su respectivo proceso de identificación.
- En la técnica laboratorial se utilizó el método de extracción del material genético, para levaduras, utilizando el kit de Promega Wizard, de acuerdo a los protocolos del fabricante. Se realizó un control positivo de DNA extraído de un control positivo para cada cepa; en este caso se utilizaron: una cepa

pura de *C. albicans*, adquiridas de INLASA, se preparó el mix de PCR con las concentraciones correspondientes de: Buffer, MgCl₂, dNTPs, Primers forward y reverse, BSA y Tag, una vez finalizado el PCR, se realizó la corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%, sembrando 5 ul, la corrida se realizó durante 20-25 minutos de 100-135V y para finalizar se coloca el gel de agarosa en Bromuro de Itidio durante 5-10 minutos, dependiendo de la antigüedad del mismo, y se observan los resultados en un transiluminador.

3.6 RECOMENDACIONES

De acuerdo al estudio y análisis de los resultados realizados sobre la presencia de *C. albicans* en el interior de los conductos radiculares en pacientes atendidos en la clínica de Especialidad de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la UMSA se recomienda lo siguiente:

- Llevar a probar nuevos medicamentos intraconductos o protocolos para eliminar a estos hongos del sistema del conducto radicular.
- Realizar más investigación para evaluar su presencia en las periodontitis periapical asintomática primaria y secundaria he implementar medidas terapéuticas que ayuden a eliminar a la *C. albicans* y otros microorganismo.
- Llevar a cabo más estudios de este tipo, utilizando el mismo protocolo de identificación, para establecer con la misma precisión la epidemiología de la *C. albicans* en la ciudad de La Paz.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen S Hargreaves K, Vías de la pulpa, Duodecima Ed, Lovish.Berman y Gary R. Hartwell, [Internet]. Del 2021. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://www.berri.es/pdf/COHEN.%20V%C3%8DAS%20DE%20LA%20PULPA/9788491139683>.
2. American Association of Endodontists, Endodontic Diagnosis, [Internet] del 2013. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/07/endodonticdiagnosisfall2013.pdf>.
3. Poptani Bruhvi, Sharaff mURali, Archana G, Parekh VaiShali, Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction, Vol 4, India , [Internet]. del 2016. [Citado] el 10 de abril del 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703696/>.
4. Vytaute Peciuliene, Rasmute Maneliene, Estera Balcikonyte, SauliusDrukteinis, Vygandas Rutkunas Microorganisms in root canal infections: A review, Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal, 10:4-9, [Internet]. Del 2008. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en: <https://sbdmj.lsmuni.lt/081/081-01.pdf>.
5. Saad Al-Nazhan, Alaa Al-Sulaiman, Fellwa Al-Rasheed, Fatimah Alnajjar, Bander Al-Abdulwahab, and Al-Badah Abdulhakeem· Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. *In vitro* SEM study, Saudi Arabia, [Internet]. del 2014 [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223094/pdf/rde-39-258.pdf>.
6. Galárraga María, Identificación Molecular y Asociación causal de Microorganismos Presentes en Lesiones Periapicales Refractarias al Tratamiento Endodóntico, Quito, [Internet]. marzo del 2016. [Citado] el

11 de marzo del 2023. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/331948177_Identificacion_molecular_y_asociacion_causal_de_microorganismos_presentes_en_lesiones_periapicales_refractarias_al_tratamiento_endodontico.

7. Aysin Dumani, Oguz Yoldas, Sehnaz Yilmaz, Fatih Koksai, Begum Kayar, Beril Akcimen, Gulsah Seydaoglu, Polymerase chain reaction of *enterococcus faecalis* and candida albicans in apical periodontitis from Turkish patients, Turkey, [Internet]. febrero del 2012. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3908807/>.
8. Waltimo Toumas., Sen B.H, Meurman J., ØRSTAVIK D., Haapasalo M., Yeasts in Apical Periodontitis, Vol.14, Turkia, [Internet]. del 2003. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12764075/>.
9. Jay Kumar, Rohit S., Madhurima S., Prabhavathi V., John Paul, Chava Deepak Chowdary, Presence of Candida albicans in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment, Turkia, [Internet] febrero del 2015. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377149/>.
10. Ledezma Gildardo, Flores Héctor, González Ana, Garrocho Arturo, Ruiz Ma., Pozos Amaury, Identificación of Cultivable Microorganisms from Primary Teeth with Necrotic Pulps, Volumen 34, N° 4, México, [Internet] julio del 2010. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://www.jocpd.com/articles/10.17796/jcpd.34.4.20124lu111544377>.
11. Waltimo Tuomas, Haapasalo Markus, Zehnder Matthias, Meyer JuRg, Clinical Aspects Related To Endodontic Yeast Infections, Vol 9. [Internet] noviembre del 2004. [Citado] el 11 de marzo del 2023. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1601-1546.2004.00086.x>.

12. Department of Conservative Dentistry and Endodontics. People's College of Dental Sciences, Bhopal, Madhya Pradesh, Endodontic Mycology: A New Perspective of Root Canal Infection, India, [Internet] noviembre del 2013. [Citado] el 20 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.rroj.com/open-access/endodontic-mycology-a-new-perspective-of-root-canal-infection-43-50.pdf>.
13. Montelongo Daniel, Lopez Jose, Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota, Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota, San Antonio USA, [Internet] año 2018 [Citado] el 20 de febrero del 2023. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30400279/>.
14. Rocas IN and J.F Siqueira Jr. Root canal Microbiota of teeth with chronic Apical Periodontitis. Journal of clinical Microbiology, 2008. [Internet] año 2003. [Citado] el 20 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2576597/>.
15. Pinheiro E., Gomes B., Ferraz C., Sousa E., Teixeira F. y Souza-Filho F., Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions, Journal 36, 1-11, Brazil, [Internet] año 2003. [Citado] el 20 de febrero del 2023. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.13652591.2003.00603.x?sid=nlm%3Apubmed>.
16. Tsui Christina, Kong Eric F., Jabra-Rizk, Mary Ann, Pathogenesis Of *Candida Albicans* Biofilm, Vol. 14, [Internet] año 2016. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5975230/>.
17. Guzman Heloisa, Garcia Rachel, Vieira Ana, Antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus PDT against intracanal *Candida albicans*: an ex vivo study, vol. 29 Saopaulo, [Internet] año 2015. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bor/a/q7d5JR9fh94S9tx65BWv99F/?lang=en>.
18. Estrela Carlos, Almeida Silva Júlio y Cols., Monitoring Nonsurgical and Surgical Root Canal Treatment of Teeth with Primary and Secondary

- Infections, Vol. 25, Brazil. [Internet] en el año 2014. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bdj/a/jwSRhVn8nSB9sb8GR8F4sXn/?lang=en>
- 19.** Sirvent F., Garcia E., Biofilm. Un nuevo concepto de infección en Endodoncia, Vol. 28, España. [Internet] en el año 2010. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: [file:///C:/Users/Denniz/Downloads/biofilm-un-nuevo-concepto-de-infecci-243-n-en%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Denniz/Downloads/biofilm-un-nuevo-concepto-de-infecci-243-n-en%20(1).pdf).
- 20.** Alvear Javier, Díaz Antonio, Pupo Stella, Identificación de Especies de *Candida* en Pacientes con Periodontitis Apicales Crónicas no Supurativas, volumen 50, Colombia. [Internet] en el año 2012. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2012/1/art-6/>.
- 21.** Silva-Herzog Daniel, *Invasión por Candida albicans y Enterococcus faecalis en dentina humana*, Revista Nacional de Odontología, Vol. 8, México. [Internet] en el año 2011. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=89906>.
- 22.** Romero D, Hernández S, Rueda F, Identificación mediante PCR de *Candida albicans* aisladas de conductos radiculares necróticos, Vol. 5 N°2, México, [Internet] año 2013. [Citado] el 8 de febrero del 2023. Disponible en: <https://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V05N2p51.pdf>
- 23.** Rosenthal P. Murray. Microbiología Médica, Séptima Ed., [Internet] año 2013. [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en: https://books.google.com.bo/books?hl=es&lr=&id=GOaVDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=28.%09Rosenthal+P.+Murray.+Microbiolog%C3%ADa+M%C3%A9dica,+S%C3%A9ptima+Ed.,+2013.&ots=hRqVNKK1mr&sig=xj5qlgBDCYS9dEy7yP_X1RcPcQ4#v=onepage&q&f=false
- 24.** Melnick A. Jawetz, Microbiología Médica, 25ma. Ed. [Internet] año 2011. [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en:

https://books.google.com.bo/books/about/Jawetz_Melnick_y_Adelberg_microbiolog%C3%ADa.html?id=rHOEBgAAQBAJ&redir_esc=y.

25. Persoon I., Crielaard W., Özok A. R., Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis, [Internet] PubMed año 2016. [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987307/>.
26. Perera J., Tormo, A., García L., Ingeniería, Genética, Vol. 1, Editorial Síntesis, España, [Internet] año 2002. [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en: <https://www.sintesis.com/genetica-136/ingenieria-genetica-vol-i-libro-692.html>.
27. De Dios T., Ibarra C., Vellasquillo C., Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y de la PCR en tiempo real, Vol. 2, México, [Internet] año 2013. [Citado] 10 de enero del 2023. Disponible en: https://www.academia.edu/16639841/Fundamentos_de_la_reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa_PCR
28. Liébana J. Microbiología Oral, Segunda ed., España, [Internet] año 2002. [Citado] 10 de enero del 2023. Disponible en: https://books.google.com.bo/books/about/Microbiologia_oral_2_Ed.html?hl=es&id=yYaGAAAACAAJ&redir_esc=y
29. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M., Microbiología Médica. Barcelona, [Internet] año 2009. [Citado] 10 de enero del 2023. Disponible en: <https://bibcatalogo.uca.es/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=856371>
30. Yábar Varas C., Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN Normas Técnicas N° 38, Lima, [Internet] año 2003. [Citado] 8 de enero del 2023. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1182204>.
31. López M. Lucio, Gracia C. María del Carmen, Hernández R. Alejandra, Sánchez S. Efraín, López L. María A., Sánchez R. Sergio H., La caries, gingivitis, periodontitis y la maloclusión siguen siendo las afecciones estomatológicas más frecuentes en la población, Vol. 9 No. 4:2, México,

PubMed Journals Our. [Internet] año 2013. [Citado] 8 de enero del 2023. Disponible en: <http://www.imedpub.com/>.

- 32.** Prevalencia de microorganismos identificados con técnicas moleculares en infección secundaria en el tratamiento de endodoncia. Una revisión de la literatura. [Internet] 21 de abril del 2020. [Citado] 8 de enero del 2023. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/53755>
- 33.** Identificación Molecular Y Asociación Causal De Microorganismos Presentes En Lesiones Periapicales Refractarias al Tratamiento Endodóntico. [Internet] marzo del 2016. [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Maria-Galarraga-Vinueza/publication/312168646_Molecular_identification_and_causal_association_of_microorganisms_present_in_refractory_periapical_lesions_to_endodontic_treatment/links/5874308208ae6eb871c690b9/Molecular-identification-and-causal-association-of-microorganisms-present-in-refractory-periapical-lesions-to-endodontic-treatment.pdf.
- 34.** Cándida Albicans En Conductos Radiculares Necróticos De Pacientes Con Diabetes Mellitus Tipo II. [Internet] marzo del [Citado] 20 de enero del 2023. Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/4599/FO-E-2018-0079.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

ANEXOS

La Paz, 11 de febrero del 2016

Dra. María Teresa Alvares Aliaga
Directora del instituto de investigaciones fármaco bioquímicas

Presente. -

REF.-ACEPTACION DE TUTORIA DE PROYECTO DE GRADO

Mediante la presente me dirijo a su persona para solicitarle la aceptación de tutoría de mi proyecto de grado "Presencia de *Cándida Albicans* en piezas dentarias con periodontitis periapical crónica primaria y secundaria", para la Especialidad de Endodoncia de la Facultad de Odontología UMSA.

Me despido de su autoridad agradeciendo sus atenciones.

Atentamente.

Revisado
13.03.16


Dra. Denniz Ventura Nogales


Dra. María Teresa Álvarez

Anexo N° 1 Comité de Ética y Bioética Aprobado por Medicina (Consentimiento Informado)



COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA

Comisión de ética de la investigación

**Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Odontología
Especialidad de Endodoncia
CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo..... de forma libre y voluntaria estoy de acuerdo en colaborar el proyecto de grado de la Dra. Stephany Mercado y Dra. Denniz Ventura, las cuales secaran dentro de mi diente con un algodón y este algodón en vez de botarlo a la basura lo utilizaran para hacerles unos estudios de laboratorio y ver si tienen unos gérmenes que podrían hacer que mi diente no sane.

Se me ha explicado el procedimiento y conozco que el estudio no me provocara ningún daño ni perjuicio, además es de mi conocimiento que no se me dará ningún tipo de compensación económica.

El proceso será estrictamente confidencial y mi nombre no será mencionado en ningún informe.

Mayor información contactar:

Dra. Mercado Cel. 70571270, Dra. Ventura Cel. 70592464

Nombre del paciente/o tutor

Firma
CI.....

Fecha

Anexo N° 2 Aval Ético Aprobado por Medicina



COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA

Comisión de ética de la investigación

AVAL ETICO

A quien corresponda:

La Comisión de Ética de la Investigación del Comité Nacional de Bioética (CEI-CNB), tiene a bien informar que fue presentado a la CEI-CNB, para su revisión y aval ético el proyecto de grado: **IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCCUSFAECALIS Y CANDIDAALBICANS EN PIEZAS DENTARIAS CON PERIODONTITIS PERIAPICAL CRÓNICA PRIMARIA Y SECUNDARIA** por las Dra. Dennis Sonia Ventura Nogales y la Dra. Stephany Mercado Canedo, ambas cursantes de la Especialidad de Endodoncia de la Universidad Mayor de San Andrés - Facultad de Odontología.

El Comité de Ética de la Investigación ha revisado la propuesta y realizó observaciones sugirió ciertas modificaciones y aclaraciones, las cuales quedaron subsanadas por las cursantes y aprobadas por su tutor Dra. María Teresa Álvarez y cuya constancia consta en los archivos de la Comisión.

Por tanto se tiene a bien certificar que el proyecto **IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCCUSFAECALIS Y CANDIDAALBICANS EN PIEZAS DENTARIAS CON PERIODONTITIS PERIAPICAL CRÓNICA PRIMARIA Y SECUNDARIA** cumple con todos los requisitos éticos, por lo que los miembros de la CEI-CNB le otorgan el respectivo AVAL ÉTICO para la prosecución en su ejecución.

Atentamente



COMITE NACIONAL DE BIOETICA
COMISION DE ETICA DE LA INVESTIGACION
Dra. INGRID GABY MELGAREJO POMAR
COORDINADOR

La Paz, agosto 8, 2016

c.c. Arch.

Anexo N° 3 Historia Clínica de la Especialidad

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO



CODIGO E - 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TRATAMIENTOS DE LA ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA II VERSION

A ser llenado a mano por el paciente mayor de edad o por el apoderado del paciente menor de edad, el presente documento debe ir acompañado de la fotocopia simple del carnet de identidad del paciente o su apoderado. Todas las hojas de este documento deben estar firmadas y selladas por el profesional a cargo del tratamiento y firmadas por el paciente o su apoderado.

Yo, el (la) Sr. (Sra.) con C.I. expedido en en mi condición de paciente del Dr. cursante de la Especialidad en Endodoncia II Versión.

DECLARO: Que el Dr. me ha explicado lo siguiente:

1. Es importante que Ud. Este informado que el tratamiento de conducto que realizamos en su(s) diente(s), es un pequeño acto quirúrgico para poder mantener se(s) pieza(s) en boca y como cualquier otro tratamiento quirúrgico es susceptible de generar algunas complicaciones.
 2. La tasa de éxito que se logra con un tratamiento endodóntico por primera instancia llega a un 85-90% y un tratamiento a segunda instancia (retratamiento) llega a un 75-80%.
 3. Que el cumplimiento por parte del paciente de la asistencia a las citas programadas y de las indicaciones e instrucciones impartidas son condición fundamental para el éxito del tratamiento. Que, en caso de no asistir a tres citas consecutivas de manera injustificada, la Facultad de Odontología considerará mi tratamiento como ABANDONO sin posibilidad de reclamo y/o reembolso.
 4. Por esta razón, queremos infórmalo sobre los procedimientos que deben cumplirse:
 - a) Ud. Debe recibir varias tomas radiográficas y/o tomográficas.
 - b) Mientras dura el tratamiento y hasta que se realice la restauración definitiva debe tener cuidado con masticar alimentos duros para evitar posibles fracturas.
 - c) Puede existir un grado de inflamación.
 - d) Cumplir con los medicamentos recetados.
 - e) En algunos casos especiales y según el criterio profesional será necesario realizar una resolución quirúrgica.
 - f) Algún accidente o complicación que se produzca durante la terapia significara en algunos casos extracción total o parcial de la pieza dentaria.
 - g) Concluido el tratamiento endodóntico debe realizarse la restauración final en un término de 10 días para evitar posibles fracturas, filtraciones u otras complicaciones.
 - h) Antes durante y después del tratamiento puede ser necesario la toma de fotografías para realizarse de forma anónima y con fines de investigación.
 - i) Durante las sesiones y concluido el tratamiento endodóntico puede ocurrir algunas eventualidades como:
 - i. Dolor leve (molestia) es normal en las primeras 48 horas.
 - ii. Dolor espontaneo o provocado (al contacto con el diente opuesto) es normal, pero el uso de un analgésico - antiinflamatorio ayudara.
 - iii. Ante un dolor fuerte espontaneo o provocado (al Contacto con el diente) le aconsejamos que retorne a la clínica para que podamos examinarlo y determinar la mejor solución.
- Ud. Ha sido informado sobre un 5-10% de fracaso que puede existir y sobre algunos aspectos que debe tener en cuenta antes de someterse a dicho tratamiento.

La Paz, de de

.....
Firma del Paciente o Apoderado - Estoy de Acuerdo con el Presente Consentimiento.

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO



CODIGO E - 2 - HISTORIA CLÍNICA

PROGRAMA DE ESPECIALIZACION ENDODONCIA II VERSION

Fecha..... Presupuesto:.....

Operador.....

Nombre y Apellido del Paciente.....

Domicilio.....

Edad..... Sexo..... Celular.....

Remitido por.....

Motivo de consulta:

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES:

- | | | |
|--|---------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Hipertensión | <input type="checkbox"/> Osteoporosis | <input type="checkbox"/> Úlcera |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Cáncer | <input type="checkbox"/> Enf. Transm. Sexual |
| <input type="checkbox"/> Hepatitis | <input type="checkbox"/> Alergia | <input type="checkbox"/> Enf. Inmunodeficiencia |
| <input type="checkbox"/> Enf. Cardíaca | <input type="checkbox"/> Asma | <input type="checkbox"/> Enf. Sicológ./ síquica |
| <input type="checkbox"/> Fiebre Reumática | <input type="checkbox"/> Epilepsia | <input type="checkbox"/> Embarazo |
| <input type="checkbox"/> Enf. Respiratoria | <input type="checkbox"/> Anemia | <input type="checkbox"/> Otros _____ |

¿Está en tratamiento médico? _____

¿Está tomando Medicamentos? c/s receta: _____

ALERGIAS _____

ANTECEDENTES ODONTOLÓGICOS:

Última visita al odontólogo (fecha, causa) _____

Alergia al anestésico Sí No

Brujismo Sí No

Examen Extraoral:

Ganglios palpables: Sin infartación Infartados

A.T.M.: _____

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO



Examen Intraoral:

PIEZA DENTARIA:

a. Síntomas Subjetivos:

Dolor: a) Presente b) Ausente
Ubicación del dolor: a) Localizado b) Difuso c) Referido d) Irradiado
Características del dolor: a) Continuo b) Intermitente
Espontáneo: a) Diurno b) Nocturno
Provocado: a) Frío b) Calor c) Presión d) Masticación
Duración: (Seg., Min., Hrs.) _____
Intensidad: a) Leve b) Moderado c) Severo
Sensación de elongación: a) Presente b) Ausente

b. Síntomas Objetivos

Extraoral: a) Tumefacción b) Presencia de tracto sinusal c) Ganglios palpables
Intraoral: a) Tumefacción b) Presencia de tracto sinusal
Corona: a) Caries b) Obturación c) atrición d) Abrasión
f) Abfracción h) Traumatismo

Otros _____

Cambio de coloración de la pieza a) Presente b) Ausente

Exposición Pulpar: a) Presente b) Ausente

c. Exámenes Clínicos

Dolor a cambios térmicos: a) Ninguna b) Frio c) Calor d) Ambos
Dolor a la percusión: a) Ninguna b) Leve c) Moderada d) Severa
Dolor a la Palpación: a) Presente b) Ausente
Excavación de caries a) Con exposición b) Sin exposición
Movilidad Dentaria: a) Grado I b) Grado II c) Grado III

d. Examen Radiográficos

Cámara Pulpar: a) Amplia b) Parcialmente calcificada c) Totalmente calcificada
d) Destruída e) Ocupada mat. RO f) Otros _____

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO



Conducto Radicular:

- | | | |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| a) Amplio | b) Parcialmente calcificado | c) Totalmente calcificado |
| a) Único | b) Múltiple | c) Bifurcado |
| a) Reabsorción Interna | b) Relleno RO | |

Cemento:

- | | | |
|----------------|--------------------------|------------------------|
| a) Normal | b) Apexogénesis Incompl. | c) Reabsorción Externa |
| d) Otros _____ | | |

Ligamento Periodontal:

- | | |
|-----------|--------------|
| a) Normal | b) Engrosado |
|-----------|--------------|

Hueso alveolar:

- | | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| a) Normal | b) Area RL apical | c) Area RL furcal |
| d) Area RL lateral | e) Otros _____ | |

DIAGNÓSTICO PULPAR.....

DIAGNÓSTICO PERIRRADICULAR.....

TIPO DE INTERVENCIÓN:.....

PRONÓSTICO POST TRATAMIENTO:.....

AUTORIZADO POR:.....

FIRMA:..... FECHA:.....



CODIGO E - 2.1. HOJA DE EVOLUCIÓN

Paciente:.....

Cursante:.....

Pieza dentaria:.....

Clamp:.....

Fecha	Long. Aparente Referencia Anatómica (Rx) (por conducto)	Long. Real Referencia Anatómica (Fx) y o Electrónico (por conducto)	Calibre Último. Instrumento Utilizado (por conducto)	Medicación Intracanal y Obturación. Temporal	Trabajo Realizado en la Sesión	Técnica De obturación (condensación lateral) *Longitud y calibre de obturación *Cemento-Sellador Utilizado Obturación final - pieza dentaria	Medicación Sistémica *Antiinflamatorio *Antibacteriano	Control Docente Firma Fecha de inicio:
1ra cita								
.....								
2da cita								
.....								
3ra cita								
.....								
4ta cita								
.....								

Accidente operatorios:.....Pronostico post tratamiento:.....

Fecha de inicio del tratamiento:.....Nº de sesiones:.....Fecha de término del Tratamiento:.....

Docente Firma:.....

Nota Docente:

Anexo Nº 4 Fotografía de Aislado Absoluto con Goma Dique



Anexo N° 5 Fotografía de Facultad de Odontología UMSA



**Anexo N° 6 Fotografía de Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica
UMSA**



**Anexo N° 7 Fotografía de la Clínica de Especialidad de Endodoncia de la
Facultad de Odontología U.M.S.A.**



Anexo N° 8 Fotografía de Resultado de Electroforesis

Corrida electroforética del marcador de peso molecular y lo primers generales y específicos utilizados para el análisis molecular de muestras dentales

<i>C. albicans</i>	Levaduras	MP
C-D	ITS1-ITS4	
158 Pb	550 Pb	

