



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA
CÁTEDRA DE ENDODONCIA

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICROBIANA DEL
HIDRÓXIDO DE CALCIO EN CUATRO DIFERENTES
VEHÍCULOS FRENTE AL *ENTEROCOCCUS FAECALIS*”**

**Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista**

**ALUMNAS:
María Alejandra Levin Jercic.
Catherine Osorio Rajcevich.
Paula Andrea Román Merdech**

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. Francisco Javier De La Maza C.**

**CO-DIRECTOR TESIS:
Dr. Jorge Torres Maldonado.**

**Valparaíso - Chile
2006**

DEDICATORIA

*A mi familia, en especial a ti... mamá:
Sigo creyendo que lo que se quiere con el corazón se logra...y esto lo hemos logrado juntos.
Gracias por ayudarme, incondicionalmente, a ser feliz
Los quiero, Ale*

*En primer lugar doy gracias a Dios por todo lo que me ha regalado en la vida...
A una familia maravillosa que me ha apoyado en cada momento...
A mi querido Padre, un ejemplo de sabiduría y cariño incondicional...
A mi querida Madre, por ser un modelo de mujer, de amor, ternura y entrega infinita....
Gracias a todos los que me han dado la oportunidad de compartir bellos momentos que llevo
siempre junto a mí y me han ayudado a ser lo que soy.
Cathy*

*A mi familia, a mi hermano, mi abuela y en especial a mis queridos padres, los que me
dieron la vida y a los cuales les debo lo que soy, ya que me sirvieron de ejemplo y me guiaron
por el camino adecuado, dándome firmes cimientos. Estuvieron siempre ahí... cuando más los
necesité. Sientan este logro tan suyo como mío, ya que sin su apoyo incondicional, no habría
podido lograrlo. A mis amigos, por su cariño, paciencia y comprensión durante todos estos
años...Gracias,
Paula*

AGRADECIMIENTOS

- A Dr. Francisco Javier De la Maza C., por su permanente dedicación y conocimientos aportados incondicionalmente en el desarrollo de nuestro seminario de tesis.
- A Dr. Jorge Torres M., por su importante colaboración y generoso apoyo durante el transcurso de nuestra investigación.
- A Dra. Rosa Moya C., por su ayuda desinteresada y vital aporte en el aspecto estadístico.
- Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por la facilitación de sus dependencias e instrumental durante la fase experimental de nuestro proyecto.
- Al personal técnico del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por su valiosa cooperación.
- A Laboratorio Maver, por su apoyo económico y de insumos necesarios para llevar a cabo nuestra investigación.
- A Dentsply Chile, por su cooperación con instrumental requerido.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
1.-Conformación del complejo pulpo-dentinario.....	2
1.1 Anatomía de los conductos radiculares.....	2
1.2 Histología del complejo dentino pulpar.....	3
1.3 Histofisiología del tercio apical.....	5
2.- Microbiología de los conductos radiculares infectados	6
2.1 Vías de invasión de la microbiota.....	7
2.2 Condiciones necesarias para el desarrollo microbiano.....	9
2.3 Características de la microbiota del sistema de conductos radiculares en Pulpas necróticas.....	12
3.- Medios de cultivo celulares.....	15
3.1 Composición clásica de un medio de cultivo.....	15
3.2 Condiciones de incubación de un cultivo.....	16
3.3 Clasificación de un medio de cultivo	16
4.- Enterococcus faecalis.....	17
4.1 Generalidades.....	17
4.2 Identificación de laboratorio.....	19
4.3 Patología y etiopatogenia.....	19
5.- Medicación Endodóntica.....	22
5.1 Antecedentes históricos.....	22
5.2 Ventajas e indicaciones de la medicación intraconducto	23
5.3 Objetivos de la medicación intraconducto.....	24
5.4 Sustancias antibacterianas utilizadas en el interior del conducto radicular...	24
6.- Hidróxido de Calcio.....	26
6.1 Características fisicoquímicas del hidróxido de calcio.....	26
6.2 Propiedades biológicas del hidróxido de calcio.....	27
6.3 Aplicaciones del hidróxido de calcio en la terapia endodóntica.....	29

6.4 Consideraciones generales de las pastas de hidróxido de calcio.....	30
6.5 Citotoxicidad.....	31
7.- Clorhexidina	32
7.1 Características generales.....	32
7.2 Formas de presentación.....	33
7.3 Mecanismo de acción.....	33
7.4 Propiedades.....	34
7.5 Citotoxicidad	35
8.- Paramonoclorofenol Alcanforado	36
8.1 Características generales.....	36
8.2 Citotoxicidad.....	38
9.- Suero Fisiológico	39
III. HIPÓTESIS	41
IV. OBJETIVOS	41
V. MATERIALES Y MÉTODOS	42
VI. RESULTADOS	52
VII. DISCUSIÓN	59
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. SUGERENCIAS	65
X. RESUMEN	66
XI. BIBLIOGRAFÍA	67
XII. ANEXOS	74

I. INTRODUCCIÓN

Es sabido que la microbiota de los conductos radiculares infectados es polimicrobiana y mixta. El principal objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar los microorganismos del sistema de conductos radiculares, mediante procedimientos endodónticos rutinarios que incluyen la limpieza y conformación del espacio pulpar. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la complejidad anatómica de los conductos y las limitaciones del acceso de los agentes terapéuticos.

Los microorganismos pueden permanecer en los túbulos dentinarios y en las demás irregularidades del conducto. Si existe suficiente número de bacterias remanentes y un microambiente adecuado, éstas pueden multiplicarse y reestablecer la infección en el espacio pulpar.

Una de las principales causas de fracaso endodóntico es la persistencia, multiplicación y migración de las bacterias desde el interior de los conductos hacia los tejidos periapicales. Siqueira et al., (2005) demostraron mediante estudios, en base a cultivos, que la microbiota de las infecciones intraradiculares persistentes está usualmente compuesta por una o dos especies de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, particularmente, *Enterococcus faecalis* (Siqueira y Rocas, 2005).

Es reconocido que *Enterococcus faecalis* aislados de conductos radiculares infectados presentan resistencia a los regímenes de tratamiento convencional recomendado para los procedimientos endodónticos.

El hidróxido de calcio es la medicación intracanal más usada actualmente, gracias a su propiedad antimicrobiana y mineralizadora. Estudios previos han sugerido un sinergismo entre hidróxido de calcio y otros medicamentos endodónticos, como clorhexidina y paramonoclorofenol alcanforado (Barbosa, 1997; Basrani et al., 2003; Estrela, 1997; Gamonal et al., 2005; Lin et al., 2003; Savafi y Nakayama, 2000; Schaëfer y Bossmann, 2005; Sukawat y Srisuwan, 2002).

Sin embargo, el tiempo necesario para que la pasta de hidróxido de calcio puro o asociado a otros vehículos actúe sobre microorganismos considerados resistentes a los agentes antimicrobianos, está siendo cuestionado y aún no ha sido bien definido.

I. MARCO TEÓRICO

El conocimiento de la anatomía e histología de los conductos radiculares es de vital importancia para la comprensión del mecanismo de permeabilidad dentinaria y la acción de los medicamentos intracanales.

1. CONFORMACIÓN DEL COMPLEJO PULPO-DENTINARIO

1.1. ANATOMÍA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

Se entiende por conducto radicular, la comunicación entre la cámara pulpar y el periodonto, que se dispone a lo largo de la zona media de la raíz.

Las raíces de los dientes se presentan en tres formas fundamentales: raíces simples, raíces bifurcadas y raíces fusionadas.

Weine, propuso la clasificación o configuración de los conductos en cuatro tipos (Walton y Torabinejad, 1997):

-Tipo I: un solo conducto desde la cámara pulpar hasta el ápice.

-Tipo II: dos conductos que partiendo de la cámara pulpar son confluyentes y terminan en un foramen.

-Tipo III: dos conductos independientes con dos forámenes en el ápice.

-Tipo IV: un conducto que partiendo de la cámara pulpar se bifurca y termina en dos forámenes independientes.

Cada uno de estos conductos puede presentar modificaciones de su anatomía.

Por la complejidad de las interrelaciones del sistema de conductos radiculares, se estableció una terminología para identificarlos (Walton y Torabinejad, 1997):

-Conducto principal: es el conducto más importante que pasa por el eje del diente y generalmente alcanza el ápice.

-Conducto bifurcado o colateral: recorre toda la raíz o parte más o menos paralelo al conducto principal, pudiendo alcanzar el ápice.

-Conducto lateral o adventicio: comunica el conducto principal o colateral con el periodonto a nivel de los tercios medio o cervical de la raíz.

-Conducto secundario: similar al lateral, comunica directamente el conducto principal o colateral con el periodonto, pero en el tercio apical.

-*Conducto accesorio*: comunica un conducto secundario con el periodonto, por lo general en pleno foramen apical.

-*Interconducto*: comunica entre sí dos o más conductos, sin alcanzar el cemento y periodonto.

-*Conducto recurrente*: partiendo del conducto principal, recorre un trayecto variable desembocando de nuevo en el conducto principal, pero antes de llegar al ápice.

-*Conductos reticulares*: conjunto de varios conductillos entrelazados en forma reticular.

-*Conducto cavo interradicular*: comunica la cámara pulpar con el periodonto en la bifurcación de los molares.

-*Delta apical*: constituido por las múltiples terminaciones de los distintos conductos que alcanzan el foramen apical múltiple, formando un delta de ramas terminales. Este complejo anatómico significa, quizás, el mayor problema histopatológico, terapéutico y de pronóstico en la endodoncia actual (Walton y Torabinejad, 1997).

1.2. HISTOLOGÍA DEL COMPLEJO DENTINOPULPAR

1.2.1. Pulpa dental:

La pulpa es un tejido conectivo laxo que se encuentra encerrado en el interior de la cámara pulpar y en los conductos radiculares, lo que condiciona que su volumen vaya disminuyendo en el transcurso de los años por la continua formación de dentina (Canalda, 2001). Está constituida por un 25% de materia orgánica (células, fibras y sustancia fundamental) y un 75% de agua.

Pashley señala que la pulpa tiene dos regiones definidas: central y periférica.

-*Zona de la pulpa periférica*: en la periferia de la pulpa, adyacente a la dentina calcificada, se observan diferentes capas estructurales. Junto a la predentina se encuentra la empalizada de células odontoblasticas columnares. En el centro de estos odontoblastos se encuentra la capa subodontoblastica denominada zona “libre de células” de Weil. Los plexos de capilares y pequeñas fibras nerviosas se ramifican en esta capa subodontoblastica. En las profundidades de la capa odontoblastica se encuentra la zona rica en células que contiene fibroblastos y células indiferenciadas (Ingle y Bakland, 1996).

-*Zona pulpar central*: se encuentra en el área circunscrita por la zona rica de células. Contiene el principal sistema de soporte para la pulpa periférica, que incluye los grandes vasos y nervios, del que se extienden ramas para inervar las capas pulpares externas (Ingle y Bakland, 1996).

1.2.2. Dentina:

La dentina es un tejido conectivo calcificado compuesto por un 70% de materia inorgánica, 18% de materia orgánica y un 12% de agua (Canalda, 2001).

Está constituida por una serie de túbulos cuya densidad varía de 15.000 a 60.000 túbulos por mm^2 . El número de túbulos es variable de acuerdo al nivel, en la dentina circumpulpar hay alrededor de 60.000 por mm^2 con un diámetro de 4 μm , mientras que en la dentina superficial, próxima al límite amelodentinario, hay unos 15.000 por mm^2 con un diámetro de 1.7 μm (Canalda, 2001).

En el interior de los túbulos se encuentran las prolongaciones de los odontoblastos, “fibrillas de Tomes”, quedando un espacio entre el citoplasma celular y la pared del túbulo el que contiene fluido dentinario, fibras nerviosas, fibras colágenas y algunos cristales de hidroxiapatita (Canalda, 2001).

La periferia del túbulo dentinario está compuesta por un anillo hipermineralizado de dentina que corresponde a dentina peritubular. Representa el principal producto secretorio de los odontoblastos (Ten Cate, 1998).

La dentina localizada entre la dentina peritubular se llama dentina intertubular y constituye el mayor componente de la dentina (Ten Cate, 1998).

1.2.2.1. Tipos de dentina

Según Ten Cate se pueden distinguir tres tipos de dentina, de acuerdo a las características de su formación:

-*Dentina primaria*: se forma desde los primeros estadios del desarrollo embriológico hasta que el diente entra en oclusión.

-*Dentina secundaria, secundaria fisiológica o regular*: se forma durante toda la vida del diente una vez que éste se pone en contacto con el antagonista. Condiciona progresivamente la disminución de la cámara pulpar y conductos radiculares. Posee túbulos dentinarios rectos y paralelos.

-*Dentina terciaria, secundaria reparativa o irregular*: se forma tras agresiones externas. Su espesor dependerá de la duración e intensidad del estímulo, condicionando la disminución irregular de la cámara pulpar. Posee túbulos dentinarios irregulares y tortuosos (Ten Cate, 1998).

1.2.2.2. Modificaciones de la dentina

En el transcurso de la vida de un diente podemos encontrar una serie de cambios de la dentina.

-*Translúcida o esclerótica*: los agentes irritantes hacen que se produzca una dentina intratubular a partir de la dentina peritubular, tendiendo a cerrar concéntricamente los túbulos dentinarios (Canalda, 2001).

-*Dentina opaca o tractos muertos*: Son áreas de dentina que presentan túbulos dentinarios vacíos, debido al retroceso o degeneración de las prolongaciones de los odontoblastos (Canalda, 2001).

1.3. HISTOFISIOLOGÍA DEL TERCIO APICAL

La región apical comprende varias estructuras cuyo conocimiento determina el éxito del tratamiento endodóntico, éstas son el conducto cementario, muñón pulpar, dentina, cemento apical, límite cemento-dentinario, foramen, foraminas, ligamento periodontal y hueso alveolar, todas ellas interrelacionadas entre sí.

1.3.1. Cemento apical: es un tejido conectivo especializado, avascular y mineralizado que rodea la porción radicular de la dentina desde la unión cemento- esmalte hasta el ápice radicular. Se compone de una matriz de sustancia fundamental amorfa y fibras colágenas que son producidas por los cementoblastos. Se reconocen dos tipos de cements a lo largo de la raíz, el cemento celular, que se encuentra en el tercio apical, y el cemento acelular que recorre la dentina en los tercios medio y cervical (Canalda, 2001; Ten Cate, 1998).

1.3.2. Dentina apical: en la región apical, los odontoblastos pulpares, se encuentran en menor número. La dentina producida por ellos es menos tubular, más amorfa, irregular y esclerótica que la dentina coronal que la hace menos permeable a microorganismos, irritantes y medicación.

1.3.3. Conducto cementario: corresponde a la región ubicada entre la constricción apical y el límite externo del foramen apical. Presenta mayor diámetro hacia el foramen (0.5 -1mm) y el menor junto al límite cemento dentinario (220um). En el tercio apical el cemento es más grueso debido a las mayores tensiones funcionales, por lo que adquiere una laminación irregular. Su longitud es de 0.5 - 0,7 mm, siendo ésta muy variable, influenciada por la continua aposición y reabsorción de cemento (Ingle y Bakland, 1996).

El lumen está ocupado por el muñón pulpar. Idealmente durante la terapia endodóntica este conducto no debe ser alcanzado por los instrumentos debido a que se compromete la reparación tisular (Ingle y Bakland, 1996).

1.3.4. Unión cemento dentinaria o límite CDC: es el límite anatómico del espacio pulpar en su parte apical. Corresponde a la transición entre el tejido de la dentina y cemento. La forma del límite CDC es altamente variable reconociéndose formas ovoides y otras muy irregulares. Su diámetro promedio es de 220um (Canalda, 2001).

1.3.5. Muñón pulpar: invaginación de tejido conectivo que proviene del ligamento periodontal ubicado al interior del conducto cementario. Este tejido no tiene odontoblastos, pero es rico en fibras y otros elementos como glicógeno y mucopolisacáridos. Tiene gran capacidad para promover la reparación y el sellado biológico del foramen apical, por aposición de cemento, cuando su vitalidad es mantenida durante el tratamiento (Canalda, 2001).

1.3.6. Foramen apical y foraminas accesorias: corresponde a las aperturas establecidas en la superficie radicular, producto de la salida y terminación de los conductos radiculares. A este nivel se establece la comunicación entre la pulpa radicular y el ligamento periodontal, conocido como unión pulpo periodontal (Weine y Pisano, 1997).

1.3.7. Ligamento periodontal apical: tejido de origen mesodérmico, cuya principal función es unir los tejidos de las raíces dentarias. Une el cemento a la pared del hueso alveolar, tanto de forma mecánica como biológica. Además posee funciones nutricionales, sensoriales y defensivas (Canalda, 2001).

1.3.8. Hueso alveolar: corresponde al tejido óseo que se encuentra por fuera del ligamento periodontal, que se continúa con el hueso esponjoso. A la radiografía se observa como una línea radiopaca, denominada lámina dura (Canalda, 2001).

2. MICROBIOLOGÍA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES INFECTADOS

Ha sido reconocido ampliamente que los microorganismos juegan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de las patologías pulpares y periapicales (Aguilar, 2004).

Cualquier lesión de la pulpa puede desencadenar una respuesta inflamatoria de la misma. Si bien los irritantes pueden ser de naturaleza física, térmica o química, los microorganismos son considerados el principal agente etiológico. Las patologías pulpares y periapicales suelen ser un resultado directo o indirecto de la presencia de bacterias y otros microorganismos en el medio bucal (Aguilar, 2004).

Dado que los microorganismos desempeñan un papel primordial en la patogénesis de las lesiones pulpares y perirradiculares es preciso manejar los fundamentos de la microbiología endodóntica para entender el papel que desempeñan en estas afecciones, las vías de difusión de la infección pulpar y periapical, las respuestas de los tejidos ante estos agresores y los métodos utilizados para controlar y erradicar las infecciones del sistema de conductos radiculares (Aguilar, 2004).

La pulpa y la dentina forman un complejo funcional, protegido tanto por sustancias exógenas de la cavidad bucal, como por estructuras dentarias (esmalte y cemento). Cuando el complejo dentino-pulpar es infectado, los tejidos reaccionan en contra de los microorganismos invasores a fin de erradicarlos. Si la infección no es erradicada a través de esos procesos naturales o procedimientos operatorios, los microorganismos invaden el complejo dentino-pulpar evadiendo el sistema inmune y causando la enfermedad pulpar, e infectando la cámara y el sistema de conductos radiculares (Bergenholtz y Crawford, 1991).

El sistema de conductos radiculares está en estrecha comunicación con los tejidos periapicales (ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar) por las vías del foramen apical, túbulos dentinarios, conductos laterales y accesorios. Los metabolitos y productos tóxicos son producidos principalmente por las bacterias presentes dentro del sistema de conductos radiculares y difunden a los tejidos periapicales desencadenando la respuesta inflamatoria (Canalda, 2001).

En 1894, Miller fue el primero en demostrar la invasión bacteriana de los túbulos dentinarios tanto de dentina cariada como no cariada así como en tejido pulpar necrótico, reportando que esta microflora tubular consistía en cocos y bacilos. Pero no fue sino hasta 1965 cuando Kakehashi y cols., proporcionaron evidencia experimental y establecieron claramente el papel fundamental de las bacterias en la enfermedad pulpar y periapical (Aguilar, 2004).

En este estudio se demostró la aparición de enfermedad pulpar y periapical en pulpas dentales sólo cuando existían bacterias en la cavidad bucal. Por el contrario, las pulpas expuestas libres de microorganismos, permanecieron sanas e iniciaron la reparación formando un puente dentinario a nivel de la exposición pulpar (Aguilar, 2004).

Según Korzen y cols., la severidad de la inflamación pulpar y periapical está directamente relacionada con la dosis infectante (cantidad de microorganismos existentes en el sistema de conductos radiculares) y con el tiempo de permanencia de los mismos dentro del sistema. Así también, comprobaron que el grado de inflamación es de mayor intensidad en infecciones mixtas que en infecciones producidas por microorganismos pertenecientes a una sola especie (Aguilar, 2004).

Poco después, Sundqvist (1976), demostró que sólo podían ser detectados signos de reacción inflamatoria en los tejidos periapicales de dientes que presentaran infección bacteriana dentro del sistema de conductos radiculares. Este autor realizó un estudio en 32 dientes monorradiculares con historia traumática previa, los que presentaban pulpas necróticas y corona clínica intacta. Diecinueve de estos dientes presentaban imagen radiolúcida; en 18 de éstos se encontró la presencia de microorganismos, no así en aquellos dientes traumatizados sin área periapical radiolúcida (Sundqvist, 1976).

Según Gamonal y cols. (2005), más de 500 especies bacterianas diferentes han sido reconocidas como componentes de la microflora bucal. Sin embargo, pocas parecen ser capaces de invadir el espacio pulpar e infectarlo. Esto sugiere que muchas de las especies en la cavidad bucal no poseen las propiedades necesarias para invadir los túbulos dentinarios y sobrevivir dentro de ese microambiente (Canalda, 2001).

2.1. VÍAS DE INVASIÓN DE LA MICROBIOTA

2.1.1. Comunicación directa de la cavidad bucal con la pulpa.

Esta situación puede deberse a diversas causas como lesión por caries, fracturas dentales (de la corona o de la raíz), derivadas de traumatismos dentales, grietas o fisuras del esmalte a consecuencia de traumatismos continuados, atrición patológica por bruxismo, oclusión traumática, abrasión, reabsorción interna-externa y maniobras operatorias que exponen accidentalmente, incluso a veces de forma imperceptible, el tejido pulpar (Liébana, 2002).

2.1.2. *Túbulos dentinarios.*

La causa más prevalente de infección de la pulpa dental es la comunicación con la dentina cariada a través de los túbulos dentinarios. Esta infección puede producirse antes de que la pulpa quede expuesta directamente al medio oral a través de la cavidad producida por la caries, por contaminación directa de las bacterias, por toxinas o por productos derivados del metabolismo bacteriano (Liébana, 2002).

Según Seltzer et al., los microorganismos pueden penetrar por los túbulos dentinarios y de esta manera, alcanzar la pulpa dental (Weine y Pisano, 1997). El tamaño promedio de las bacterias es de 0,5 micrones y el diámetro promedio de los túbulos dentinarios es de 2 a 4 micrones, lo cual hace compatible estos hallazgos. La invasión y el avance de los microorganismos obedece principalmente a dos mecanismos: la simple división celular y la presión ejercida por fuerzas de oclusión, operatoria o maniobras periodontales (Teixeira y Cortés, 2005).

Nagaoka et al., (1995), en un estudio de invasión bacteriana en túbulos dentinarios de dientes vitales y desvitalizados, observaron que la penetración es mayor en dientes no vitales y la diferencia es muy significativa cuando el tiempo de exposición es mayor. Concluyeron que los factores de la invasión bacteriana a través de los túbulos son: la condición del proceso odontoblástico y las fibras colágenas en los túbulos. La vitalidad del proceso odontoblástico actuaría como barrera física, en cambio en dientes no vitales, al deteriorarse, aumentaría la permeabilidad, con mayor tasa de invasión (Ribeiro, 2002).

Pashley et al., (1995) en un estudio acerca de la capacidad de la endotoxina bacteriana para difundir a través de la dentina humana, observaron que en un corto período de tiempo puede difundir a través de una lámina de 0,5mm de espesor de dentina. Debido a su alto peso molecular, la endotoxina es uno de los productos metabólicos más grandes liberados por las bacterias. Si ellas pasan a través de la dentina, se sugiere que todos los productos bacterianos son potencialmente capaces de alcanzar el órgano dentino-pulpar (Ribeiro, 2002).

2.1.3. *Vía periodontal.*

En las enfermedades periodontales puede producirse destrucción del aparato de inserción del diente. Si un conducto lateral, conducto en el techo de la furca o en la profundidad de la bolsa periodontal alcanza la proximidad del agujero apical, puede irritarse la pulpa dental, con su consiguiente inflamación (Liébana, 2002).

2.1.4. *Extensión de una lesión periapical de dientes infectados adyacentes.*

La infección de la pulpa dental puede ocurrir a causa de procesos infecciosos adyacentes a la estructura dentaria, como por ejemplo infección apical en dientes vecinos. Cuando un diente vecino a otro con infección periapical sufre pulpitis o traumatismo intenso, los microorganismos se extienden con facilidad a través del sistema sanguíneo y linfático, por contigüidad o por compresión (Weine y Pisano, 1997).

2.1.5. Vía hematológica.

Mecanismo por el cual las bacterias pueden colonizar e infectar la pulpa dental vía hemática, debiendo existir un proceso inflamatorio en el tejido pulpar que incapacite los mecanismos de defensa y posibilite las condiciones necesarias para la colonización bacteriana (Liébana, 2002).

2.2. CONDICIONES AMBIENTALES NECESARIAS PARA EL DESARROLLO MICROBIANO

Existen ciertas condiciones y mecanismos que permiten que ciertas bacterias puedan sobrevivir y multiplicarse en un ambiente más propicio.

Los microorganismos que componen la microflora oral, coexisten en ecosistemas primarios que están regulados por una serie de factores conocidos como determinantes ecológicos que son de cinco tipos: fisicoquímicos; de adhesión, agregación y congregación; nutricionales; protectores del hospedero y antagónicos interbacterianos (Caviedes y Meneses, 2005).

2.2.1. Fisicoquímicos:

-Humedad

Las bacterias dependen de ella para el intercambio de nutrientes, reacciones metabólicas y eliminación de productos inhibidores de desecho.

-pH

En condiciones normales el pH de la cavidad oral oscila entre 6.7 y 7.5, pero constantemente está sometido a variaciones que afectan el metabolismo bacteriano.

-Temperatura

La temperatura oral está próxima a los 37°C pero tiende a variar temporalmente por la ingesta de alimentos calientes o fríos, lo que provoca eliminación de microorganismos de forma transitoria.

-Potencial de óxido-reducción

El hábitat de los gérmenes anaerobios tiene una baja tensión de oxígeno y un potencial de óxido reducción disminuido, resultado de la actividad metabólica de los microorganismos que consumen oxígeno mediante su respiración.

2.2.2. Factores de adhesión, agregación y coagregación:

-Adhesión

Interrelación que se da entre los microorganismos y el hospedero, que permite la colonización de los tejidos.

-Agregación y Coagregación

Unión entre bacterias de la misma o diferente especie respectivamente que les permite acumularse y formar colonias (Aguilar, 2004)

2.2.3. Factores nutricionales:

Los componentes del tejido pulpar degenerado aportan una fuente nutricional importante en las fases iniciales de la colonización bacteriana. Otro factor esencial lo constituye el exudado inflamatorio. Si se presenta una comunicación entre el espacio pulpar y el medio bucal, la saliva aportará elementos que fomentarán el crecimiento bacteriano (Aguilar, 2004).

2.2.4. Protectores del hospedero:

Son todos aquellos factores que limitan por parte del hospedero el ingreso, penetración y colonización bacteriana tales como: integridad de mucosas y del tejido dental, masticación, deglución, tejidos linfoides y la saliva, por su acción mecánica, química e inmunitaria (Bergenholtz y Crawford 1991).

2.2.5. Interacciones bacterianas:

Existe un intercambio de nutrientes entre diversas especies; el crecimiento de una bacteria depende de los productos metabólicos de otras. Así mismo, las bacterias pueden contrarrestarse entre sí produciendo metabolitos capaces de suprimir o eliminar otras especies, lo que fomenta la complejidad del ecosistema que constituye el sistema de conductos radiculares (Bergenholtz y Crawford 1991).

2.2.6. Carácter de la invasión:

El número de bacterias que colonizan la pulpa o el periápice es directamente proporcional a la magnitud de la puerta de entrada de las mismas. Cuanto más importante sea la invasión bacteriana, mayor será la respuesta inflamatoria. Con respecto a la dosis infectante, se considera que es más relevante la patogenicidad (capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible) y su capacidad para multiplicarse, que su cantidad. Por otra parte, bacterias con una alta tasa metabólica tienen mayor capacidad de liberar endotoxinas, exotoxinas, exoenzimas y productos metabólicos, por lo tanto serán más virulentas (Canalda, 2001).

2.2.7. Factores de Virulencia:

Los factores de virulencia bacteriana son las propiedades que contribuyen a que un patógeno infecte y dañe los tejidos del huésped, contribuyendo a la invasión y toxicidad microbiana (Mateos, 2006).

2.2.7.1. Endotoxinas.

La pared celular de las bacterias Gram negativas, como la *Porphyromona*, *Fusobacterium*, contiene endotoxinas (lipopolisacáridos LPS). Este componente bacteriano es el principal factor de patogenicidad, y ejerce su efecto en la amplificación de las reacciones inflamatorias. Las endotoxinas son antígenos no específicos que son pobremente neutralizados por los anticuerpos. Son además capaces de activar la vía del complemento sin la participación de anticuerpos, lo cual resulta en la activación de la cinina y de la cascada de coagulación y estimulación de la liberación de interleuquina 1 (IL1), siendo capaces de inducir respuestas inflamatorias a nivel periapical aún en pequeñas cantidades, así como destrucción ósea (Caviedes y Meneses, 2005).

2.2.7.2. Exoenzimas.

Especies bacterianas, de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas*, así como *Peptostreptococcus spp*, *Fusobacterium spp* y *Enterococcus spp*, son capaces de liberar enzimas que participan en la destrucción del tejido pulpar y periapical favoreciendo la progresión de la invasión bacteriana, dentro de las cuales se encuentran: heparinasa, fibrinolisisina y colagenasa, entre otras (Canalda, 2001).

2.2.7.3. Metabolitos.

La simbiosis bacteriana intraductal es variada y compleja, existiendo el comensalismo, sinergismo, interrelación, antibiosis y coagregación. Debido a lo anterior, la producción de metabolitos puede beneficiar o perjudicar a una determinada especie bacteriana (Canalda, 2001).

La degradación de aminoácidos por medio de la acción de la descarboxilasa, producidas por *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp*, *Fusobacterium spp*, conducen a la formación de amoníaco, tóxico para los tejidos del hospedador; además es una fuente nitrogenada para bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Leptotrichia* y *Lactobacillus*. Gran parte de bacterias Gram negativas anaeróbicas, producen dióxido de carbono que es necesario para estimular el crecimiento de bacterias capnofílicas. La acción del catabolismo del lactato por la acción de *Veillonella* forma gas hidrógeno necesario para especies bacterianas anaerobias, como las pertenecientes a los géneros *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* y *Porphyromonas*. Otros metabolitos utilizados por los microorganismos son menadiona, formato, acetato, succinato y hemina (Canalda, 2001).

2.2.7.4. Exotoxinas.

Son proteínas solubles y difusibles de elevado peso molecular que poseen un efecto necrótico directo sobre los tejidos con las que contactan. Presentan una acción específica, son termolábiles, sensibles a la acción de enzimas proteolíticas, presentan un poder inmunógeno elevado y se neutralizan por anticuerpos homólogos. Son producidas tanto por bacterias gram positivas como gram negativas. Entre las especies aisladas de conductos radiculares que producen exotoxinas se encuentran: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aereginosa*.

Una vez diseminados los productos tóxicos enzimáticos y metabolitos de origen bacteriano, se produce colonización microbiana dentro del conducto radicular (Canalda, 2001).

2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MICROBIOTA DEL SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES EN PULPAS NECRÓTICAS

Las bacterias presentes en conductos infectados comprenden un número restringido de especies comparadas con el total de la microbiota bucal.

De acuerdo a Siqueira et al., (2001), para que un microorganismo pueda establecerse en el sistema de conductos radiculares y consecuentemente participar en la etiopatogenia de las lesiones perirradiculares requiere de ciertas características.

- Presentarse en un número suficiente para iniciar y mantener la lesión perirradicular.
- Poseer una matriz de factores de virulencia, la cual debe expresarse durante la infección del conducto radicular.
- Estar localizado espacialmente en el sistema de conductos radiculares de tal manera que sus factores de virulencia puedan ganar acceso a los tejidos perirradiculares.
- El ambiente del sistema de conductos radiculares debe permitir la supervivencia y crecimiento del microorganismo, y proveer señales que estimulen la expresión de factores de virulencia.
- Los microorganismos inhibidores deben estar presentes en bajo número o ausentes en el microambiente del sistema de conductos radiculares.

- El hospedero debe desarrollar una estrategia de defensa a nivel de los tejidos perirradiculares, con la finalidad de inhibir la diseminación de la infección. Este proceso dará como resultado un daño tisular.

Existen diferentes tipos de infecciones endodónticas del sistema de conductos radiculares, que usualmente están asociadas con condiciones clínicas distintas. Siqueira describe cuatro tipos:

- *Infección primaria*: causada por la colonización de microorganismos en el tejido pulpar necrótico. Las pulpas necróticas presentan una flora polimicrobiana caracterizada por una amplia variedad de combinaciones de bacterias, un promedio de 4-7 especies por conducto, predominantemente anaerobias y aproximadamente igual proporción de bacterias Gram positivas *Peptostreptococcus*(35%), *Eubacterium*, *Psedoramibacter* y Gram negativas *Fusobacterium*(35%), *Prevotella*(16,7%), *Porphyromonas*(13,7%), *Campylobacter* (Siqueira y Rocas, 2005).

- *Infecciones secundarias / persistentes*: pueden ser responsables de algunos problemas clínico como exudado o sintomatología persistente, exacerbaciones y persistencia de las lesiones perirradiculares posterior al tratamiento. Los cultivos han demostrado que la microbiota de este tipo de infecciones al contrario de las infecciones primarias, está usualmente compuesta por una o dos especies. Bacterias facultativas Gram positivas, particularmente, *Enterococcus faecalis*, son los predominantes (Siqueira y Rocas, 2005).

- *Infecciones extraradiculares*: pueden ser causadas por una infección intrarradicular o ser independiente de ellas. Algunas especies bacterianas bucales, bajo ciertas circunstancias, tienen el potencial para desarrollar estrategias para sobrevivir en los tejidos perirradiculares. Las infecciones extraradiculares rara vez ocurren independiente de las intraradiculares, dada la alta tasa de éxito de tratamiento endodóntico (Siqueira y Rocas, 2005).

Siqueira et al., califican las infecciones endodónticas como mixtas y semi-específicas con predominio de bacterias anaerobias estrictas. La característica de semi-específica de estas infecciones está dada por la correlación entre algunos grupos bacterianos y algunas formas de enfermedad periapical. Esto indica que existen interrelaciones entre ciertas bacterias comensales o antagonistas (Siqueira et al, 2001).

Las especies bacterianas dentro del sistema de conductos radiculares infectados pueden variar considerablemente. El predominio de la microbiota endodóntica se caracteriza por la presencia de cocos y bacilos. Otros estudios han demostrado igualmente la presencia de filamentosas y espiroquetas (Aguilar, 2004).

El número de células bacterianas presentes en conductos radiculares infectados oscila por lo general entre 10^2 a 10^8 bacterias por miligramo de contenido radicular. Se ha demostrado una correlación entre el tamaño de la lesión periapical y el número de especies bacterianas presentes en el sistema de conductos radiculares (Canalda, 2001).

Los hongos en conductos radiculares infectados no son microorganismos frecuentemente encontrados en infecciones endodónticas primarias, su presencia es más común en infecciones secundarias o persistentes (Canalda, 2001).

En 1982, Fabricius et al., reportaron que en pulpas desvitalizadas e infectadas el 85-98% de las bacterias aisladas fueron anaerobias. Cuando la pulpa se vuelve necrótica hay un aumento de las especies anaerobias estrictas Gram negativas y Gram positivas que ocurre a expensas de especies anaerobias facultativas (Aguilar, 2004).

En el segmento apical de los conductos radiculares, las bacterias proteolíticas constituyen la proporción principal de la microflora aislada. Se puede presumir el contacto íntimo con los tejidos periapicales vitales, aumenta la presión de oxígeno e inhibe su crecimiento. Sin embargo, la pequeña proporción de anaerobios facultativos presentes en la región apical pueden consumir el oxígeno molecular disponible dando por resultado un bajo potencial de óxido-reducción que favorece la colonización de las especies anaerobias estrictas (Canalda, 2001).

Infecciones Primarias			
Lesión periradicular crónica *	Absceso periradicular agudo **	Infecciones Secundarias o persistentes ***	Infecciones extraradiculares ****
Bacteroides	Porphyromonas	Enterococcus	Actinomyces
Treponema	Treponema	Actinomyces	Propionibacterium
Prevotella	Fusobacterium	Streptococcus	
Porphyromonas	Bacteroides	Candida	
Fusobacterium	Prevotella	Propionibacterium	
Pepstostreptococcus	Streptococcus	Staphylococcus	
Eubacterium	Pepstostreptococcus	Pseudomonas	
Actinomyces			
Campylobacter			

Referencias:
 * Sunqvist 1976, 1992, Baumgartner 1991, Gomes 1996, Haapasalo 1986, Le Groff 1997, Machado 2000, Rocas 2001, Siqueira 2000
 ** Machado 2000, Rocas 2001, Siqueira 2001a, 2001b, 2001c, Sunqvist 1989, van Winkelhoff 1985
 *** Molander 1998, Peculien 2000, Sunqvist 1998, Waltimo 1997, Siren 1997
 **** Happonen 1986, Sjögren 1988

Tabla I. Género de patógenos endodónticos comúnmente asociados a diferentes formas de lesiones periradiculares (Siqueira, 2002).

3. MEDIOS DE CULTIVOS

Cada microorganismo requiere condiciones básicas para su crecimiento. Para conseguir su desarrollo en el laboratorio, es fundamental otorgarle condiciones físico-químicas óptimas a través de un medio de cultivo (Liébana, 2002).

Un medio de cultivo es un preparado que intenta reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos (Liébana, 2002).

3.1. COMPOSICIÓN CLÁSICA DE UN MEDIO DE CULTIVO

Las sustancias más importantes que se añaden a un medio de cultivo para satisfacer los requisitos nutricionales son (Liébana, 2002).

-*Agua*: componente básico para la vida.

-*Peptonas*: se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. Constituyen una fuente fundamental de nitrógeno, carbono y azufre.

-*Hidratos de carbono*: se utiliza universalmente glucosa. Constituyen, tras la degradación enzimática por el microorganismo, una fuente de energía y de carbono.

-*Extracto de carne*: concentrado de productos hidrosolubles de composición indefinida (corazón, cerebro, músculo, hígado).

-*Extracto de levadura*: fuente importante de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

-*Cloruro de sodio*: equilibra la presión osmótica del medio.

-*Agentes solidificantes*: se incorporan para obtener medios de cultivo sólidos o semisólidos. El más utilizado es el agar, polímero obtenido de algas rojas como *Gelidium corneum*. Otro compuesto de este tipo es la gelatina.

3.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE UN CULTIVO

Las condiciones necesarias para la incubación de un medio de cultivo son (Liébana, 2002).

-*Temperatura*: en general 36+ -1°C.

-*Atmósfera*: depende del tipo de respiración que posea el microorganismo. Las bacterias aerobias o anaerobias facultativas se incuban en presencia de oxígeno; las anaerobias estrictas requieren un 85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y 5% de dióxido de carbono. Y las microaerófilas un 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno.

-*Presión osmótica*: concentración de 1% de cloruro de sodio.

-*Humedad*: favorece el crecimiento de todos los microorganismos.

-pH: la mayoría de las bacterias crecen con pH cercanos a la neutralidad.

3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

3.3.1. Según su contenido (Liébana, 2002):

-*Definidos o sintéticos*: se conoce perfectamente la composición química ya que se elaboran con productos puros e individualizados.

-*No sintéticos o empíricos*: Son los medios más utilizados (ej. agar cerebro-corazón o agar Müeller-Hinton).

3.3.2. Según su estado físico (Liébana, 2002):

-*Líquidos*: reciben el nombre de caldo o infusión. Los constituyentes están disueltos en agua sin sustancias solidificantes.

-*Semisólidos*: contienen agar en escasa proporción

-*Sólidos*: se obtienen agregando agar al medio líquido en una cantidad suficiente para que solidifiquen (generalmente 1.5-2%).

3.3.3. Según su utilización en el laboratorio (Liébana, 2002):

-*Básicos o comunes*: son aptos para bacterias no exigentes y contienen los nutrientes mínimos para el desarrollo.

-*Enriquecidos*: se suplementan con sustancias nutritivas para bacterias muy exigentes, como la sangre y suero.

-*Selectivos*: permiten el crecimiento de algunas bacterias e inhiben otras. La selección puede ser por inhibición o por enriquecimiento.

4. ENTEROCOCCUS FAECALIS

Las infecciones radiculares son mixtas compuestas por ocho o más cepas, con predominio de tres o cuatro de éstas. La monoinfección experimental del sistema de conductos radiculares ha demostrado que la respuesta perirradicular es mínima y la infección dura muy poco; sólo algunas bacterias como los *Enterococcus*, pueden sobrevivir como infecciones aisladas.

4.1. GENERALIDADES

E. faecalis es una bacteria anaerobia facultativa, coco Gram positivo. Sus células miden entre 0.5 y 1 μ m de diámetro. Se disponen solos, en pares o en cadenas pequeñas. Son inmóviles y no hemolíticos. Los *Enterococcus* son usualmente catalasa negativos aunque algunos tests pueden volverlos ampliamente positivos. Son clasificados como streptococci grupo D debido a que tienen el antígeno Grupo D de Lancefield en su pared (antígeno ácido glicerol teitoico) (Rodríguez, 2002).

La superficie de las colonias en agar sangre son blancas y lisas (Rocas y Siqueira, 2004).

La curva de crecimiento de *E. faecalis* refleja que la cantidad de células se incrementa exponencialmente durante las primeras 6 horas de incubación (fase de crecimiento exponencial). Desde las 6 hasta las 24 horas, la cantidad de células permanece estable (fase estacionaria); ésta decrece entre las 24 y 36 horas, estabilizándose después de esto (fase de muerte celular) (Anexo imagen nº45) (Portenier et al., 2005).

E. faecalis presenta un metabolismo fermentativo que convierte los carbohidratos a ácido láctico. Usualmente son considerados fermentadores estrictos porque carecen de ciclo de Krebs. *E. faecalis* es una de las pocas bacterias que produce una gran cantidad de oxígeno extracelular.

Presenta un mecanismo de homeostasis catiónica el que contribuye ampliamente a su resistencia al pH, sales, metal y desecación (Siqueira et al., 1997).

Su hábitat natural es el intestino de animales y humanos (Liébana, 2002). Son capaces de crecer en rangos de temperatura de 10° a 45°C en medios hipotónicos, hipertónicos, acídicos o alcalinos. Como facultativos, pueden vivir en medios oxigenados o con bajas concentraciones de oxígeno. Pueden sobrevivir hasta 60°C por 30 minutos. *Enterococcus faecalis* es capaz de crecer en 6.5% NaCl y son particularmente resistentes a las sales biliares (Rodríguez, 2002)

4.1.1. Estructura celular:

E. faecalis posee las estructuras celulares clásicas de una bacteria Gram positiva. Sin embargo adquiere especial importancia la membrana celular y plasmidios implicados en la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos (University of Maryland, 2000).

-*Estructuras citoplásmicas:* el citoplasma contiene DNA cromosómico, RNAm, ribosomas, proteínas y metabolitos. Las células procarióticas carecen de plástidas autónomas como las mitocondrias. Las enzimas del transporte de electrones se encuentran localizadas en la membrana celular (Yawetz, 1992; Murray, 2002).

Es frecuente la presencia de gránulos citoplasmáticos insolubles como forma de almacenamiento de materiales de reserva.

- *Nucleoide:* región del citoplasma que contiene fibrillas de DNA, acompañado de cantidades más pequeñas de RNA. Se caracteriza por la ausencia de membrana nuclear y de sistema mitótico. El DNA del núcleo bacteriano puede extraerse como una única molécula continua que se encuentra en contacto con un punto de una invaginación de la membrana celular denominada mesosoma.

-*Envoltura celular:* constituida por tres capas: membrana citoplasmática, una capa gruesa de péptido glucano y una capa exterior denominada cápsula.

Membrana citoplasmática: estructura lipídica de doble capa compuesta de fosfolípidos y proteínas, pero con ausencia de esteroides, que permite permeabilidad selectiva y transporte de solutos; excreción de exoenzimas hidrolíticas; porte de enzimas y receptores de membrana.

Pared celular: ubicada entre la membrana citoplasmática y la cápsula. Constituida por peptidoglucano, ácidos teicoicos y polisacáridos. Además de proporcionar protección osmótica, desempeña un papel esencial en la división celular funcionando como un primordio para su propia biosíntesis. Varias de sus capas son sitios de determinantes antigénicos primordiales de la superficie celular. La pared celular en general, es permeable sin selectividad específica.

Cápsula: material extracelular constituido por un polisacárido condensado que rodea estrechamente a la célula. Contribuye a la invasividad de las bacterias patógenas.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO

Los *E. faecalis* están capacitados para desarrollarse en los siguientes medios experimentales (Estrela, 1997; Ferrari et al, 2005; Pinheiro et al 2004; University of Maryland 2000).

En un medio no selectivo como agar sangre o agar chocolate se desarrolla a una temperatura entre 10° a 45° C con un crecimiento óptimo a 35° C; 0.1% leche azul de metileno; 40% de sales biliares; agar Bilis Esculina; caldo SF (*Streptococcus* [*Enterococcus*] *faecalis*); caldo cerebro-corazón; Todd-Hewitt; agar m-Enterococcus; agar Mueller-Hinton; agar enterococosele; caldo soya tripticasa.

4.3. PATOLOGÍA Y ETIOPATOGENIA DE E. FAECALIS

Según Jett y cols. *E. faecalis* puede ser el factor etiológico de una amplia variedad de enfermedades en humanos, infectando tracto urinario, sangre, endocardio, abdomen, tracto biliar y heridas producidas por quemaduras (Kayaoglu, 2005).

También ha sido implicado en infecciones endodónticas. Aunque ellos constituyen sólo una pequeña proporción de la flora inicial en dientes no tratados con pulpas necróticas (Kayaoglu, 2005; Rocas et al, 2004; Siqueira et al, 2002).

El atributo más sorprendente de los enterococos es su resistencia a los antimicrobianos de uso más común en las infecciones por Gram positivos. Los enterococos poseen una variedad de mecanismos de resistencia adquiridos, los que están mediados en su mayoría por genes codificados en plasmidios (University of Maryland, 2000; Rodriguez, 2002).

Poseen múltiples factores de virulencia como factores fibrinolíticos, factores proteicos y carbohidratos que regulan la adherencia y colonización. Además, las bacteriocinas liberadas inhiben la competitividad bacteriana constituyendo sus mecanismos de patogenicidad (University of Maryland, 2000).

E. faecalis no posee una toxina potente y aunque se han identificado proteínas hidrolíticas, no está definido su papel en la enfermedad.

A pesar de la falta de factores de virulencia significativos, su rol en la enfermedad está mediado por una combinación de estos factores (Murray, 2002):

Factores de colonización:

-*Sustancia de agregación:* proteína de aspecto veloso de la membrana citoplasmática que facilita el intercambio de plásmidos y la unión a células epiteliales.

-*Adhesinas hidrocarbonadas*: presentes en bacterias individuales con muchos tipos de adhesinas, median en la unión con las células del huésped.

Factores secretados:

-*Citolisina*: bacteriocina proteica que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas (favorece la colonización); produce daño tisular local.

-*Feromona*: quimioatrayente para los neutrófilos que puede regular la reacción inflamatoria.

-*Gelatinasa*: hidroliza gelatina, colágeno, hemoglobina, y otros péptidos pequeños.

-*Resistencia a antibióticos*: aminoglucósidos, β -lactámicos y vancomicina.

Es posible que miembros de una flora bacteriana atípica se encuentren presentes en bajo número en el canal radicular al inicio del tratamiento endodóntico, y que poco a poco vayan predominando hasta el final de terapia debido a una inadecuada limpieza quimiomecánica o por errores en el sellado del conducto (Sedgley et al, 2005).

Se ha demostrado que debido a la contaminación con saliva del conducto radicular, por una mala técnica aséptica o por dejar el conducto abierto a la cavidad bucal, son cada vez más frecuentes los casos en que están presentes *Actinomyces* y *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares y lesiones periapicales, principalmente en lesiones que no responden al tratamiento endodóntico convencional ni a la terapia antibiótica habitual (Caviedes y Meneses, 2005).

Sundqvist et al., (1998) especularon que *E. faecalis* puede introducirse al conducto y persistir después de la obturación (Sedgley et al, 2005). Siqueira (2001) postuló que la bacteria cubierta por el material de obturación usualmente muere, pero que algunas especies cubiertas, sobreviven por periodos relativamente largos, nutridos por tejidos remanentes.

Enterococcus faecalis ha sido frecuentemente encontrado en conductos radiculares obturados con signos de periodontitis apical crónica, siendo aislado en un 23 a 70% de los cultivos positivos de tales dientes. (Engström 1964 ; Möller 1966 ; Molander et al., 1998 ; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Hancock et al., 2001; citados en Kayaoglu et al, 2005).

Según Peciulienė et al., (2001) la recuperación de *E. faecalis* desde conductos radiculares obturados fallidos no parece estar relacionado con el uso de un determinado material de obturación (Sedgley et al, 2005).

Según Sherman, *E. faecalis* puede sobrevivir a condiciones ambientales extremas incluyendo altos niveles de alcalinidad (Kayaoglu et al, 2005).

La mayoría de las bacterias patógenicas en humanos no son capaces de sobrevivir en un medio extremadamente alcalino. Una de las más resistentes es el *Enterococcus faecalis*, pudiendo sobrevivir en pH 11,5, sensibilizándose al pH 12 del hidróxido de calcio (Rocas et al, 2004).

Según Flahaut et al, *E. faecalis* puede crecer a pH 9.6 y tolerar niveles de pH tan altos como 11.9 (Rocas et al, 2004).

Estudios previos han demostrado que el *E. faecalis* es resistente al tratamiento con hidróxido de calcio (Byström et al. 1985; Haapasalo & Orstavik 1987; Orstavik & Haapasalo 1990; Haapasalo et al. 2000) probablemente debido a su mecanismo de bombeo de protones el que mantiene niveles de pH citoplasmáticos ideales (Kayaoglu et al, 2005).

Así mismo Evans et al, estudiaron los mecanismos involucrados en la resistencia del *E. faecalis* al hidróxido de calcio. El autor confirmó que la bacteria es resistente a la eliminación por el hidróxido de calcio a pH menor a 11.1 Una respuesta adaptativa a la alcalinidad del pH y al stress inducido, es la síntesis de proteínas que parece jugar un rol principal en la sobrevivencia celular. Sin embargo, el funcionamiento de la bomba de protones, con la capacidad de acidificar el citoplasma, es fundamental para la supervivencia de *E. faecalis* a alto pH (Evans et al, 2002).

La homeostasis de pH está basada en una función pasiva de la membrana celular, que consiste en la disminución de su permeabilidad a iones por medio de la capacidad buffer del citoplasma y a un mecanismo activo de transporte de cationes (potasio, sodio y protones) a través de la membrana celular (Booth, 1985, 1999 ; Kakinuma, 1998).

En medios ácidos, un sistema antiportador de cationes expelle protones a través de la membrana celular. En medios alcalinos, cationes y protones, son bombeados dentro de la célula para bajar el pH interno (Booth, 1985; Hall et al 1995; Booth, 1999; citados en Kabayashi , 1984).

La adhesión al hospedero por parte de los microorganismos es el primer paso en la mayoría de las enfermedades infecciosas. Se ha demostrado la adherencia del *E. faecalis* a proteínas de la matriz extracelular, incluyendo al colágeno tipo I (Zareba et al 1997; Xiao et al 1998, Rich et al 1999; Nallaparedd et al 2000; Love 2001; Rozdzinski et al, 2001; citados en Kayaoglu et al, 2005).

Las falencias del hidróxido de calcio para eliminar al *E. faecalis* de los conductos radiculares también puede deberse a que su efecto alcalino incrementa la adhesividad de la bacteria. La adherencia bacteriana a la superficie del colágeno se incrementa gradualmente desde pH 7.1 a pH 8.5 (Kayaoglu et al, 2005)

E. faecalis pueden persistir después de la instrumentación, medicación y aún después de la obturación del conducto incrementando el riesgo a la enfermedad post tratamiento. (Byström et al 1987; Sjögren et al 1991; citados en Vivacqua-Gomes, 2005).

Comparado a los anaerobios, los microorganismos facultativos parecen ser más resistentes a los antimicrobianos y a los procedimientos mecánicos endodónticos (Evans et al, 2002). *Enterococcus faecalis* revela una alta resistencia a las cefalosporinas y a la penicilina (Caviedes y Meneses, 2005).

Es muy importante la resistencia de alto nivel adquirida a los aminoglucósidos que provoca resistencia a la combinación sinérgica de éstos con agentes betalactámicos, asociación terapéutica muy usada y para la cual debe estudiarse la sensibilidad frente a una infección grave por enterococos.

5. MEDICACIÓN ENDODÓNTICA

5.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1829, S.S. Fitch, proporcionó diversas fórmulas para aliviar el dolor dental, píldoras conteniendo principalmente opio, alcanfor, aceite de clavos y aceite de casia, láudano, esencia o extracto de brandy, etc (Bóveda, 2004).

En 1836, Spooner introduce el arsénico.

En 1900, A.W. Harlam, recomendó el uso de una solución de papaína para la absorción del tejido pulpar muerto en el conducto radicular. Alrededor de esta fecha, la pirozona, una solución concentrada de peróxido de hidrógeno, tomó gran popularidad para la esterilización de los conductos radiculares (Bóveda, 2004).

En 1906, Buckley introdujo el tricresol y la formalina. Esta preparación se popularizó entre muchos dentistas y sigue siendo utilizada por algunos. A. Gysi introdujo su "pasta trío" conteniendo formaldehído, tricresol y creolina para la momificación del tejido pulpar (Bóveda, 2004).

En 1917, R. Howe, recomendó el nitrato de plata amoniacado para la impregnación del tejido pulpar remanente y superficie del conducto (Bóveda, 2004).

Durante muchos años se dio a las sustancias químicas, colocadas como medicación temporal en los conductos radiculares, un papel relevante en la mantención de conductos libres de bacterias. La base principal para conseguir un tratamiento de conductos radiculares exitoso parecía radicar en el medicamento utilizado (Canalda, 2001).

La popularización de los instrumentos estandarizados pertenece a la década de los setenta. Sin embargo, sólo a fines de ésta, comenzaron a extenderse técnicas seriadas como la step-back. Al mejorar la limpieza y desinfección de los conductos gracias a la aparición de sucesivas técnicas de instrumentación, fue decayendo el uso de los medicamentos intraconducto (Canalda, 2001).

5.2. VENTAJAS E INDICACIONES DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Se han enumerado algunas posibles ventajas de la medicación temporal en el tratamiento de dientes con conductos infectados (Bóveda, 2004):

1. Eliminación de las bacterias persistentes en los conductos tras su preparación.
2. Neutralización de residuos tóxicos y antigénicos remanentes.
3. Reducción de la inflamación de los tejidos periapicales.
4. Disminución de exudados persistentes en la zona apical.
5. Constitución de una barrera mecánica ante la posible filtración de la obturación temporal.

Aunque algunas de estas indicaciones son cuestionables y su papel es secundario a la instrumentación e irrigación de los conductos radiculares, la medicación intraconducto con materiales poco irritantes puede estar indicada en el tratamiento de dientes infectados en los siguientes casos (Canalda, 2001):

1. La anatomía de los conductos radiculares es bastante más compleja de lo que aparentan las radiografías, con múltiples zonas inaccesibles a la instrumentación y a la irrigación.
2. En las periodontitis se producen reabsorciones del ápice, formándose cráteres que anidan bacterias que permanecen inaccesibles al tratamiento.
3. La falta de una medicación intraconducto disminuye el porcentaje de éxitos en los dientes con conductos infectados.

5.3. OBJETIVOS DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

- *Eliminación de microorganismos:* el objetivo es esterilizar (destruir todos los microorganismos viables) o desinfectar (destruir todos los patógenos) en el espacio del conducto (Bóveda, 2004).

- *Hacer inerte el contenido de los conductos radiculares:* representa un intento de momificar, fijar o neutralizar los tejidos o remanentes dejados ya sea con o sin intención en el espacio pulpar. Si esto se lograra, causaría la transformación de estos remanentes y los haría no irritantes (Bóveda, 2004).

- *Prevenir o controlar el dolor postoperatorio:* el objetivo es reducir o alterar la respuesta inflamatoria, mediante su acción antimicrobiana. Esto reduciría el dolor que frecuentemente

acompaña a la inflamación. También podría controlarse por la acción química y farmacológica del medicamento en contacto directo con los nervios sensoriales de la pulpa o del tejido periapical. Si se inhibe la conducción nerviosa, se previene la transmisión del dolor hacia el sistema nervioso central (Bóveda, 2004).

- *Mejorar la acción anestésica:* se ha sugerido que estos medicamentos reducen la sensibilidad de la pulpa inflamada y difícil de anestesiar (Bóveda, 2004).

- *Control del absceso periapical persistente:* se ha propuesto el uso de medicamentos para el control de conductos con exudado persistente o dolor significativo y/o inflamación posterior al tratamiento. En estos casos el medicamento debería estar en contacto con la lesión periapical (Bóveda, 2004).

5.4. SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS UTILIZADAS EN EL INTERIOR DEL CONDUCTO RADICULAR

Los antisépticos son medicamentos inespecíficos que actúan sobre todas las especies bacterianas por desnaturalización de las proteínas celulares. Poseen una acción tóxica inespecífica sobre las células vitales y una posible acción inmunógena, ya que son haptenos que pueden transformarse en inmunógenos complejos al combinarse con las lipoproteínas del mismo organismo (Bóveda, 2004).

5.4.1. Mecanismo de acción

Tienen efectos destructivos directos en las bacterias, produciendo desnaturalización de las proteínas del microorganismo. En presencia de antimicrobianos como fenol, timol, cresol y eugenol, puede haber coagulación de proteínas y pérdida de las funciones metabólicas de la bacteria (Spangberg, 1994)

La membrana bacteriana constituye una barrera selectiva que regula la concentración de sustancias vitales en el interior y exterior de la célula, es necesaria para el metabolismo y la función, por lo que necesita estar intacta. Algunas sustancias, como los detergentes, actúan como germicidas al modificar y dañar las propiedades físicas y químicas de la membrana bacteriana (Bóveda, 2004).

Sustancias como el yodo, cloro y metales pesados oxidan o se ligan a los grupos –SH de las proteínas enzimáticas que contienen cisteína, inhibiéndolas (Bóveda, 2004).

5.4.2. Antisépticos comúnmente utilizados

- *Alcoholes:* el alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e isopropílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) desnaturalizan proteínas y se aplican en grandes concentraciones. No se recomienda el uso de alcoholes como antisépticos intracanaliculares por su escaso efecto antimicrobiano (Bóveda, 2004).

- *Compuestos fenólicos:* son el grupo de sustancias más utilizadas en la medicación intraconducto. Poseen una acción antibacteriana variable en función de su composición química. Entre los compuestos fenólicos tenemos los siguientes: eugenol, paramonoclorofenol, paramonoclorofenol alcanforado, cresatina o acetato de metacresilo, cresol, creosota y timol (Bóveda, 2004).

a. Eugenol: presenta actividad antiséptica ligera y, según se cree, sedativa. Según Seltzer, a bajas concentraciones de eugenol se producen efectos antiinflamatorios y anestésicos locales sobre la pulpa dental, pero a altas concentraciones, es citotóxico (Canalda, 2001).

b. Paramonoclorofenol alcanforado: el paramonoclorofenol alcanforado (PMCFa) es el antiséptico intraconducto más utilizado. Su acción antibacteriana deriva de los dos radicales que lo componen, el fenol y el cloro, sin embargo, su utilización por si solo cada vez debería ser menor (Bóveda, 2004).

- *Aldehídos:* el formaldehído, paraformaldehído o trioximetileno, el formocresol y el glutaraldehído son potentes antibacterianos, pero pueden causar necrosis de los tejidos periapicales sin ocasionar ningún alivio del dolor. Su principal indicación es el tratamiento de la pulpa expuesta en dientes temporales (Canalda, 2001).

a. Formocresol: es la combinación de un compuesto fenol como el cresol y un aldehído, el formaldehído. Se ha utilizado como un fijador hístico, especialmente en la biopulpectomía parcial de dientes temporales, con la intención de aliviar el dolor, efecto aún no demostrado (Bóveda, 2004).

- *Compuestos halogenados:* utilizados en endodoncia desde principios del siglo XX. Los más empleados son los que liberan cloro, un potente agente antibacteriano (Basrani et al, 2003). El hipoclorito de sodio, en soluciones del 1 al 5%, es el compuesto universalmente usado en el interior de los conductos como irrigante. La solución yodurada de yodo-potasio posee un potente efecto antibacteriano, pudiéndose utilizar en casos refractarios de tratamiento. Sin embargo, es muy irritante y se debe utilizar con precaución en los dientes anteriores por el peligro de causar tinciones (Bóveda, 2004).

- *Antibióticos:* desde los años cincuenta se han propuesto numerosas combinaciones de antibióticos para ser usadas como medicación temporal en los conductos radiculares: penicilina, bacitracina, estreptomycin, nistatina. Más recientemente se han propuesto combinaciones de ciprofloxacino, metronidazol y amoxicilina, eficaces en estudios in Vitro (Basrani et al, 2003).

Las combinaciones de antibióticos en el interior de los conductos radiculares, a pesar de su eficacia, pueden tener efectos adversos: posibilidad de sensibilizar a los pacientes, provocar reacciones alérgicas en pacientes ya sensibilizados, facilitar la aparición de cepas bacterianas resistentes y permitir el crecimiento de hongos (Bóveda, 2004).

En dientes con periodontitis apical se recomienda efectuar una medicación intraconducto utilizando una pasta acuosa de hidróxido de calcio, tras finalizar la instrumentación, manteniéndola durante una o dos semanas (Bóveda, 2004).

En dientes que presentan periodontitis con tratamiento previo, ante la posibilidad de que existan especies bacterianas resistentes, se recomienda mezclar hidróxido de calcio con paramonoclorofenol alcanforado, por el mismo período de tiempo (Bóveda, 2004).

En casos de apicoformación, en que la medicación ha de permanecer mayor tiempo en el conducto, se recomienda un vehículo viscoso para la pasta de hidróxido de calcio (Bóveda, 2004).

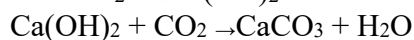
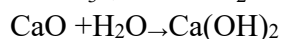
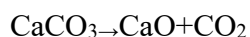
6. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio es la medicación intracanal más empleada actualmente, ya que ha resistido las pruebas de la investigación y del tiempo.

En 1920, Hermann, utilizó por primera vez el hidróxido de calcio, como recubrimiento en pulpas expuestas. A lo largo de la historia existen múltiples estudios que avalan al hidróxido de calcio como una buena medicación intraconducto, pero aún se continúa estudiando su mecanismo de acción y efectos como medicación (Estrela, 1997).

6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio se presenta como un polvo blanco, alcalino (pH 12,8), poco soluble en agua (solubilidad de 1,2 g/litro de agua, a 25° C). Se trata de una base fuerte obtenida a partir del calentamiento del carbonato de calcio, hasta su transformación en óxido de calcio (cal viva). Con la hidratación del óxido de calcio se llega al hidróxido de calcio y la reacción entre éste y el gas carbónico lleva a la formación del carbonato de calcio, así representadas:



La difusión de los iones hidroxilo del hidróxido de calcio confiere actividad antibacteriana, que cuando es empleada como medicación intracanal, altera el metabolismo enzimático de las bacterias, a partir de la influencia de un gradiente de pH existente en la membrana citoplasmática (Tronstad et al, 1981; Wang & Hume, 1988; Fuss et al, 1989, 1996; Nerwich et al, 1993; Foster et al, 1993; Estrela et al, 1995; Gomes et al, 1996; Rehman et al, 1996; Estrela et al, 1997 ; citados en Estrela, 1997).

Tomando en cuenta el peso molecular del hidróxido de calcio (74.08), el porcentaje de iones hidroxilo, encontrados en el hidróxido de calcio, corresponde a un 45.89%, mientras que 54.11% corresponde a los iones calcio. (Estrela & Pesce, 1996; citado en Estrela, 1997).

Las alteraciones de las propiedades biológicas pueden deberse a que el hidróxido de calcio en presencia de dióxido de carbono se transforma en carbonato de calcio presentando características químicas de un óxido ácido débil. Este producto formado, es desprovisto de las propiedades biológicas del hidróxido de calcio, como la capacidad mineralizadora (Estrela & Pesce, 1996; Estrela et al, 1997; citados en Estrela, 1997).

Los iones calcio del hidróxido de calcio tienen una participación activa en la mineralización (barrera dentinaria), sellado biológico apical y de los túbulos dentinarios (EDA, 1961; Oíán, 1971; Heithersay, 1975; Holland et al, 1978; Holland et al, 1982; Pashley et al, 1986; Seux et al, 1991; Wakabayashi et al, 1993; citados en Estrela, 1995)

Kwon et al, (1997) sugieren que la presencia de smear layer previene la difusión de los iones hidroxilo del hidróxido de calcio a través de los túbulos dentinarios. La hidroxiapatita de la dentina tiene una fuerte capacidad buffer que debe ser sobrepasada por la difusión de los iones hidroxilo a través de los túbulos dentinarios, por lo tanto el valor del ph alcanzado, sería insuficiente para destruir *E. faecalis* que pueden sobrevivir a ph 12,5 (Almyroudi et al, 2002).

6.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO

6.2.1. Antibacterianas

La variación del pH promueve dos tipos de efectos sobre la bacteria, inhiben la reproducción o conducen a la muerte. Estos efectos son ejercidos esencialmente por interferir en la síntesis de la pared celular, alterar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, interferir en la síntesis proteica o en la replicación cromosómica y en el crecimiento bacteriano; una vez que influencia la actividad enzimática. Estas enzimas pueden estar presentes tanto extra como intracelularmente (Bazin & Prosser, 1988; Neidhart, 1990; Nisengard & Newman, 1994; citados en Estrela et al, 2005)

Estrela et al, proponen que en condiciones extremas de pH por largos períodos de tiempo, se produciría una inactivación enzimática bacteriana irreversible o una temporal, cuando se produce retorno al pH ideal, existiendo nuevamente actividad enzimática por parte de las bacteriana (Estrela, 1997).

El transporte químico en la membrana celular puede ser alterado por la cantidad de iones hidroxilos presentes, mediante el proceso de peroxidación lipídica, evidenciada en la destrucción de ácidos grasos insaturados o fosfolípidos. Cuando los iones hidroxilo remueven átomos de hidrógeno de ácidos grasos insaturados, se forma un radical lipídico libre que reacciona con el oxígeno molecular, transformándose en otro radical peróxido lipídico. La peroxidación lipídica puede ser formada nuevamente a partir de un nuevo inductor, iones hidroxilo, que roban átomos de hidrógeno de un segundo ácido graso insaturado, resultando en otro peróxido lipídico y otro nuevo radical lipídico libre, transformándose en una reacción en cadena (Rubin & Farber, 1990; Estrela et al., 1995).

Otra forma de acción antimicrobiana del hidróxido de calcio fue demostrada estudiando su efecto sobre el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Los iones hidroxilo pueden hidrolizar el LPS presente en la pared celular de las bacterias, degradando el lípido A y neutralizando su efecto residual después de la lisis celular (SafaviI & Nichols 1993, 1994; Barthel et al 1996; Safavi & Nichols, 1993; citados en Estrela et al, 2005)

6.2.2. Antiinflamatorias

El hidróxido de calcio posee un efecto antiinflamatorio debido a su acción higroscópica, mediante la cual extrae líquido de la zona inflamada (Foreman y Barnes, 1990).

Los iones calcio forman puentes de calcio-proteínas, con las proteínas que se encuentran en la sustancia intercelular de las células endoteliales, esta combinación impide la salida de líquido al espacio intersticial (Foreman y Barnes, 1990).

Los iones calcio del hidróxido de calcio pueden reducir la permeabilidad de nuevos capilares en el tejido de granulación de dientes despulpados, disminuyendo la cantidad de líquido intercelular. Además una alta concentración de iones calcio puede activar la aceleración de la pirofosfatasa, que tiene una función importante en el proceso de mineralización. Heithersay, 1975; citado en Estrela, 1997).

Según Pashley et al (1986), existe un aumento de la concentración de iones calcio, provenientes del hidróxido de calcio, en el interior de los túbulos dentinarios. Este bloqueo físico promueve la reducción de la permeabilidad dentinaria (Estrela, 2005). También inhibe la enzima fosfolipasa que actúa en la liberación de prostaglandinas, mediadores químicos de la inflamación, por lo tanto es indirectamente antiinflamatorio (Ribeiro, 2002).

6.2.3. Osteogénicas

El hidróxido de calcio posee un potencial osteogénico indirecto dado por su alcalinidad y por acción de los iones Ca^{++} .

Los iones OH^- conducen a una menor tensión de oxígeno y a un aumento del pH. La disminución de la tensión de oxígeno en el tejido favorece la formación y reparación ósea. El entorno alcalino tiene un efecto favorable sobre la mineralización. El elevado pH existente neutraliza el ácido láctico secretado por los osteoclastos, además es desfavorable para la actividad de la colagenasa e hidrolasa, disminuyendo así la reabsorción ósea (Foreman y Barnes, 1990).

Wakabayashi et al (1993), determinaron que en las fases iniciales de la reacción reparadora se produce la formación de calcificaciones y de una capa necrótica, vistas como precipitación rápida de cristales por neutralización. Su lento crecimiento produce una barrera (calcificación distrófica), sobre la cual se depositan directamente el calcio y el fósforo adicionales (Wakabayashi et al, 1995).

En este contexto, el hidróxido de calcio activa la fosfatasa alcalina a partir de su elevado pH, lo que puede iniciar o favorecer la mineralización (Mitchell & ShankWalker, 1958; Tronstad et al, 1981; Tronstad, 1991). Esta enzima puede separar los ésteres fosfóricos con el fin de liberar los iones fosfatos, que reaccionan con los iones de calcio provenientes del torrente sanguíneo, para formar un precipitado de fosfato de calcio en la matriz orgánica, que es la unidad molecular de la hidroxiapatita (Seltzer & Bender, 1979; citado en Estrela, 1997).

Además, cabe destacar la capacidad de inactivar el LPS, endotoxina de la membrana externa de la pared bacteriana de los gérmenes gram negativo. Ésta es liberada por lisis bacteriana, que estimula la formación de prostaglandina E2 activadora de la función osteoclástica, por ello al inactivar el LPS es indirectamente osteogénico (Ribeiro, 2002)

Debido a sus propiedades y características, el hidróxido de calcio es ampliamente indicado en muchos procedimientos de la terapia odontológica: recubrimiento pulpar directo, pulpotomía, apexificación, apexogénesis, traumatismos, reabsorciones externas y reabsorciones internas (Estrela et al, 2005).

6.3. APLICACIONES DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO DURANTE LA TERAPIA ENDODÓNTICA

- *Hidróxido de calcio como irrigante*: conocida como lechada de cal; en las biopulpectomías tiene efecto de irrigante hemostático, impidiendo la hemorragia tardía por no generar vasodilatación compensatoria. Comparada con otros, tiene mejor acción bactericida, pero no mejor irrigante ya que no posee gran capacidad de disolución de tejidos (Estrela et al, 2005).

-*Cemento sellador*: utilizado para cubrir la dentina, rellenar las irregularidades y discrepancias entre el material de obturación y las paredes del conducto, logrando así el sellado. Es biocompatible y de baja toxicidad a los tejidos. Sólo desarrolla su acción biológica y microbiológica si ocurre la liberación del ión calcio e hidroxilo (Estrela, 1997).

-*Medicación intraconducto*: corresponde a la colocación de un fármaco al interior de la cavidad pulpar entre sesiones, necesarias para la terminación del tratamiento endodóntico, destruyendo microorganismos residuales, sus toxinas y removiendo el tejido orgánico (Estrela, 1997).

6.4. CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CALCIO

Al discutirse la medicación intracanal, se debe conocer el mecanismo de acción de lo que se pretende analizar como medicación. El hidróxido de calcio actúa contra todos los tipos respiratorios de microorganismos (aerobios, microaerófilos y anaerobios), inactivando sistemas enzimáticos presentes en la membrana citoplasmática, con la subsiguiente alteración de mecanismos biológicos dependientes de la membrana, promoviendo efectos tóxicos y lesivos a las células microbianas (Estrela et al, 1994, 1995). Sin embargo, para que el efecto sea letal es necesario que la medicación tenga un tiempo suficiente de acción para expresar su efectividad antimicrobiana y sea capaz de actuar a distancia. Así, la penetrabilidad dentinaria de la pasta de hidróxido de calcio y el período prolongado de acción, lo destaca de otras medicaciones intracanales (Estrela, 1995; Ribeiro, 2002).

Existe controversia en relación al tiempo que necesita el hidróxido de calcio en diferentes vehículos para alcanzar el pH necesario para ejercer su acción antimicrobiana. Sjögren demostró que las bacterias no pueden sobrevivir después de 7 días, a la medicación intracanal con hidróxido de calcio (Barbosa et al, 1997). Por el contrario, Estrela et al, estudiando el efecto antimicrobiano indirecto del hidróxido de calcio, en los túbulos dentinarios infectados, demostraron que la cantidad de iones hidroxilo (OH⁻), liberados por hidróxido de calcio en 7 días, fue insuficiente para eliminar *E.faecalis*, induciendo, solamente una inactivación enzimática reversible (Estrela, 1997).

Se debe destacar que a mayor velocidad de disociación y difusión de iones hidroxilo, mayor es el efecto antimicrobiano. Por el contrario, la concentración de hidróxido de calcio es inversamente proporcional al tiempo de contacto con los microorganismos (Ferreira et al, 1978; citado en Estrela, 1997)

El efecto del hidróxido de calcio como medicación intracanal en dientes portadores de lesiones periapicales, puede favorecer la reparación y permitir la obturación convencional del canal radicular (Holland et al, 1983; citado en Estrela, 1997)

El estudio de la eficacia antimicrobiana de pastas de hidróxido de calcio en contacto directo sobre los microorganismos, y las variadas opciones de vehículos utilizados con el objetivo

de aumentar el efecto antimicrobiano del hidróxido de calcio, deben ser investigadas, en cuanto al comportamiento directo e indirecto. Las características químicas de los vehículos, ya sea hidrosoluble o aceitoso en conjunto con su disociación iónica y capacidad de difusión, pueden ser consideradas propiedades tan o más importantes, que la acción antimicrobiana del vehículo. Por último también es importante la proporción polvo-líquido de la medicación. Alguno de los vehículos son (Estrela, 1997):

- Solución acuosa de metil celulosa (Berk, 1950; Laws, 1962; Maisto & Capurro, 1964).
- Agua destilada (Holland et al, 1978, 1983).
- Solución fisiológica (Estrela & Pesce, 1996, 1997).
- Solución anestésica (Stamos et al, 1985).
- Polietileno glicol y propilenglicol (Holland et al, 1978, 1983).
- Paramonoclorofenol alcanforado (Laws, 1962; Bramante et al, 1986).
- Aceite de oliva (Lopes et al 1996).
- Lipiodol (Holland et al, 1978, 1983).
- Clorhexidina (Estrela, 1997; Lynne, 2003; Schaëfer y Bossmann 2005).

Según sus características químicas, los vehículos se presentan como hidrosolubles acuosos (suero fisiológico, agua destilada, solución anestésica, clorhexidina); viscosos (polietileno glicol, propileno glicol, metil celulosa) y no hidrosolubles o aceitosos (paramonoclorofenol alcanforado, aceite de oliva, lipiodol), prefiriendo ocupar vehículos hidrosolubles (Lopes, 1986; citado en Estrela, 2005).

6.5. CITOTOXICIDAD

Según Ribeiro (2004), el Hidróxido de Calcio no causa daño al DNA en células de mamíferos, lo que permite realizar estudios y cultivos celulares.

7. CLORHEXIDINA

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La Clorhexidina es un fármaco que ha sido utilizado desde hace varios años en la odontología como un importante antiséptico para el control de los microorganismos causantes de la caries dental y de otras patologías relacionadas con los tejidos de soporte.

Es un antiséptico bisguanídínico de molécula simétrica compuesta de dos anillos clorofenólicos, y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno. Este compuesto es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH de más de 3.5, con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno. La naturaleza dicatiónica de la clorhexidina la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, y efectos secundarios locales (Bascones y Manso, 1994).

Esta solución puede aparecer como digluconato, gluconato o acetato de clorhexidina, sin que parezcan existir diferencias en cuanto al mecanismo de acción en sus diferentes formas químicas, aunque sí se han encontrado en su concentración (Yang y Rivera, 1996)

Su estructura química corresponde a $C_{22}H_{30}C_{12}N_{10} \cdot 2C_6H_2O_7$, con un peso molecular calculado de 897,77 (PerioAid/ PerioGard).

Entre otras características de la clorhexidina se pueden mencionar:

- Agente antimicrobiano de amplio espectro.
- Gran biocompatibilidad (Leonardo et al, 1999).
- Sustantividad de 48-72 horas.
- Alto peso molecular y baja toxicidad.
- pH fisiológico: 7.4.
- Baja toxicidad por su nula o baja permeabilidad (Bascones, 1994).
- Baja tensión superficial: por lo que puede penetrar en conductos accesorios, y túbulos dentinarios hasta una profundidad de 100um (Vadhaty y Pitt, 1993)
- No es cáustico como el NaOCl (Leonardo et al, 1999).

-Fácil almacenamiento y manipulación (Leonardo et al, 1999).

-Alto costo.

7.2. FORMAS DE PRESENTACIÓN

- Enjuagatorios al 0,10% - 0,12% - 0,2%- 2%- 5%.
- Gel 0,1% - 0,12% - 1%- 2%.
- Barniz 1% con Timol y al 10%

Como irrigante endodóntico es utilizado al 0.12% o 2%, demostrando propiedades antibacterianas como el hipoclorito de sodio, pero a diferencia de éste, continúa su liberación por un período de 48 a 72 horas posterior a la instrumentación (Yang y Rivera, 1996). Si es utilizado al 0.2% causa mínima toxicidad al tejido, sin embargo éste no disuelve el tejido pulpar. Aunque su prolongada presencia dentro de un conducto puede ayudar a la acción antibacteriana (Baumgartner, 1987).

En un estudio realizado por White et al, (1997) se investigó el efecto residual de la clorhexidina sobre la dentina a dos concentraciones distintas, se obtuvieron resultados excelentes en cuanto a la inhibición de crecimiento bacteriano, hasta 72 horas con la concentración de 0,12% y por más de 72 horas con la concentración al 2,0%, lo que confirma que puede ser utilizada como irrigante en la terapia endodóntica y más aún, utilizada como medicamento intraconducto entre citas para controlar la infección (White y Hays, 1997)

7.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CLORHEXIDINA

Las características claves en relación con la muerte de bacterias por la acción de la clorhexidina se resumen básicamente en cuatro mecanismos:

1. *Absorción*: la solución se absorbe en la célula debido a la carga negativa de la pared celular bacteriana. La cantidad absorbida, depende de la concentración utilizada, luego, a mayor concentración, mayor acción sobre los microorganismos (Schaëfer y Bossmann, 2005).
2. *Daño de las barreras de permeabilidad en la pared celular*: la absorción conduce a una alteración de la movilidad electroforética y del intercambio iónico, originando trastornos metabólicos de las bacterias (Bascones y Manso 1994; Siqueira et al, 2002). Éste corresponde al efecto bacteriostático (Bascones y Manso, 1994; Jones, 1997).
3. *Precipitación proteica en el citoplasma bacteriano*: a altas concentraciones de clorhexidina, la sustancia después de actuar sobre los componentes de la membrana bacteriana puede ocasionar y facilitar una disociación de los componentes intracelulares,

logrando una precipitación e inactivando sus procesos reproductivos y vitales (White y Hays, 1997).

4. *Sustantividad*: actividad residual extendida que crea la clorhexidina al ser utilizada como fármaco intraconducto, donde hay un mayor tiempo de contacto entre la sustancia y el sustrato (Komorowski, 2000). Esta propiedad es importante, ya que es necesario este tiempo para inhibir o eliminar microorganismos. La clorhexidina se adsorbe sobre la superficie de los tejidos bucales, incluso los dientes, luego se libera lentamente en forma activa, es decir como catión (Verdelis, 1999). En la mucosa bucal penetra limitadamente adhiriéndose a las glucoproteínas, liberándose gradualmente y uniéndose a las proteínas libres salivales (Bóveda, 2004).

7.4. PROPIEDADES

La clorhexidina posee un amplio espectro antibacteriano, activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, anaerobios facultativos y aerobios (Bascones y Manso, 1999). Su acción antiviral incluye VIH, herpes simplex, citomegalovirus, influenza, bacilo tuberculoso. Se ha demostrado que los microorganismos Gram positivos son más sensibles que los Gram negativos y los estreptococos más que los estafilococos (Bascones y Manso, 1994).

En cuanto a la susceptibilidad, los *Streptococos mutans*, *salivarius* y *coli* presentan una alta susceptibilidad, los *Streptococos sanguis*, intermedia y las cadenas de *proteus*, *Pseudomonas* y *Klebsiela* baja. Las bacterias Gram positivas son inhibidas con concentraciones de 10 microgramos por mililitro o menos, existiendo cierta diferencia entre especies, mientras que las bacterias Gram negativas muestran un rango mayor de variabilidad, 50 microgramos por mililitro, aunque algunas cepas como la especie *Proteus* tienen una concentración inhibitoria mínima de 100 microgramos por mililitro (Genco y Hammond, 1993).

Al evaluar la actividad antibacteriana de diferentes medicamentos intraconductos, la solución de clorhexidina muestra actividad antimicrobiana contra todas las cepas bacterianas comúnmente presentes en infecciones endodónticas, incluyendo al *Enterococcus faecalis* (Barbosa et al, 1997).

Usada como medicación intraconducto, en concentraciones de 1%, la clorhexidina muestra actividad antimicrobiana satisfactoria (Leonardo, 1999; citado en Evans, 2002). Estudios posteriores proponen que la solución de clorhexidina al 2% es más eficiente en un periodo de tiempo más corto que otras concentraciones testeadas (Schaëfer y Bossmann, 2005).

La clorhexidina como irrigante, puede desinfectar los túbulos dentinarios y al mismo tiempo ser absorbida por la dentina, pero puede tener mejores resultados usándola como medicación intraconducto por varios días (B. J. Lenet, 2000; citado en Bóveda, 2004).

Komorowski observó que la infección causada por *E. faecalis* en los túbulos dentinarios se redujo considerablemente, y que éste fue incapaz de colonizar el túbulo dentinario por 21 días

después que la raíz fue tratada con clorhexidina durante 7 días. Esto confirma que el potencial antimicrobiano de la clorhexidina se extendió al menos 3 veces (Leonardo et al 1999).

Estudios que comparan el efecto de clorhexidina e hidróxido de calcio contra *E. faecalis* avalan a éste, en comparación con clorhexidina, como el que tiene mejor efecto antibacteriano, y aumentado aún más combinando ambos (Schaëfer y Bossmann, 2005).

Lin et al, (2003) proponen que no existen diferencias significativas en los efectos como medicación entre clorhexidina y clorhexidina con hidróxido de calcio.

Basrani y cols (2004) demostraron que la clorhexidina disminuye el ángulo de contacto e incrementa la viscosidad del hidróxido de calcio significativamente. La clorhexidina en diferentes concentraciones y en combinación con hidróxido de calcio tiene propiedades fisicoquímicas satisfactorias usadas en la medicación intracanal.

Su actividad no se ve afectada por la presencia de sangre u otras sustancias orgánicas, sin embargo su acción puede verse alterada por surfactantes no iónicos o aniones inorgánicos presentes en el agua dura y componentes utilizados en su preparación, razón por la cual su actividad es fórmula dependiente y esto determina las distintas concentraciones de uso (Bascones y Manso, 1994).

Sus excelentes propiedades antibacterianas indican que la clorhexidina, puede ser un buen sustituto en pacientes alérgicos al hipoclorito de sodio, y en dientes con ápices muy abiertos. Debido a que carece de efecto disolvente de tejido, es posible combinarla con quelantes u otras soluciones irrigadoras, ya que puede favorecer la acción antimicrobiana y la disolución de tejido (Bascones y Manso, 1994).

7.5. CITOTOXICIDAD

Se ha descrito, en muy raras ocasiones, cierta sensibilización al fármaco, y efectos sistémicos colaterales a éste por ingestión del compuesto (Case, 1977). Su escasa absorción, por su alto peso molecular, es un factor importante que demuestra su baja toxicidad. Así en estudios realizados en humanos, luego de una ingesta de 300 mg. los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzaron un peak de 0,206 ug/gr 30 minutos después de la ingesta (PDR 1993; Marundale, 1993). Luego el 90 % de lo retenido se excreta por las heces, y lo que permanece se elimina por la orina (Bascones y Manso, 1994).

A pesar de lo anterior, se han descrito algunos efectos locales, los más frecuentes son tinción de dientes y obturaciones, que se pueden corregir con profilaxis y pigmentación del dorso de la lengua, eliminable con el cepillado (Genco y Hammond, 1993). En menor frecuencia se han descrito descamación de la mucosa bucal, gusto amargo o modificación gustativa, sensación de

quemadura, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida (Genco y Hammond, 1993).

Estudios in vivo sugieren que el uso de clorhexidina al 2 % para irrigación subgingival no es tóxico para el ligamento periodontal, lo que la hace biocompatible como irrigante (Leonardo et al 1999; Southard et al, 1989). Además reduce la reacción inflamatoria del periodonto al ser utilizada como medicación (Lindsborg y Blomlöf, 1998).

8. PARAMONOCLOROFENOL ALCANFORADO

8.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Es un compuesto fenólico constituido por una mezcla líquida en partes variables del paramonoclorofenol con el alcanfor; 25 a 35% de paramonoclorofenol y 65 a 75% de alcanfor.¹⁸ El alcanfor es, químicamente, una cetona derivada del canfeno, obtenida de la canforeira, árbol de la familia de las lauráceas. Se presenta bajo la forma de cristales incoloros o masas cristalinas translúcidas, untuosas al tacto con olor fenólico penetrante característico y sabor amargo; es una sustancia aromática, muy poco soluble en agua (1:800). Presenta pH 5.0 (Estrela et al, 1997, 2005).

Su acción antibacteriana deriva de los dos radicales que lo componen, el fenol y el cloro. La asociación del paramonoclorofenol con el alcanfor disminuye su efecto irritante hístico. Su acción desaparece en un 90% en las primeras 24 horas cuando se coloca impregnando un algodón en la cámara pulpar. Cuando se deposita en el interior de los conductos radiculares, se ha demostrado, que a través del ápice, se distribuye sistémicamente, detectándose en sangre y en orina, aunque no se conoce bien la posible repercusión de estos hallazgos (Bóveda, 2004; Caviedes y Meneses, 2005).

Pucci (1942) señaló que el alcanfor es el disolvente que sirve de vehículo aceitoso y neutraliza la acción irritante del paramonoclorofenol (Estrela, 1997).

Su baja tensión superficial puede facilitar su difusión a través de los túbulos dentinarios y los conductos (Estrela, 2005).

Como el paramonoclorofenol alcanforado presenta características químicas aceitosas, se hace difícil imaginar que este medicamento se presente con baja tensión superficial, lo que favorecería la capacidad de penetración en los túbulos y ramificaciones dentinarias (Kuroda,

1926; Cwikla, 1972; Vantulok & Brown, 1972; Souza et al, 1978; Biral et al, 1982; citados en Estrela, 1997).

El paramonoclorofenol alcanforado, cuando es empleado en asociación al hidróxido de calcio, funciona como vehículo aceitoso, en razón que el alcanfor es considerado un óleo esencial (Tasman, 2000).

Después que el hidróxido de calcio es mezclado con PMCFA, la sal paramonoclorofenolato de calcio, libera paramonoclorofenolato y OH, ambos bactericidas (Sukawat y Srisuwan, 2002)

Al respecto, Estrela & Pesce (1996) mediante el análisis químico de pastas de hidróxido de calcio, frente a la liberación de iones calcio, de iones hidroxilo, y la presencia de tejido conjuntivo, reportan que un vehículo agregado a hidróxido de calcio pro-análisis para la confección de la pasta, influencia la velocidad de disociación iónica, las propiedades físico-químicas y consecuentemente la acción antibacteriana y mineralizadora.

Siqueira et al (1996) estudiaron que la desinfección por medicación de hidróxido de calcio asociado a suero fisiológico y a PMCFA, en dentina bovina infectada con *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*, en periodos de 1 hora, 1 día y 1 semana. Los resultados mostraron que la medicación de hidróxido de calcio con PMCFA fue efectiva matando bacterias en los túbulos después de 1 hora de exposición, excepto los *E. faecalis* que requiere 1 día de exposición. La medicación de hidróxido de calcio asociada al suero fisiológico fue inefectiva después de una semana de exposición al *Enterococcus faecalis* (Estrela, 1997).

Siqueira et al (1997), evaluaron la actividad antibacteriana de la medicación de hidróxido de calcio asociada al PMCFA y glicerina, conteniendo diferentes proporciones de yodoformo sobre bacterias anaerobias estrictas y facultativas (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sanguis*), a través de un método de difusión en agar. Los resultados mostraron que la adición de yodoformo a la medicación no interfiere en sus propiedades antibacterianas y que el elemento responsable de la actividad antimicrobiana exhibida por la medicación fue probablemente el PMCFA liberado (Estrela, 1997).

Estrela et al (1995), analizaron el efecto antibacteriano de dos medicaciones de hidróxido de calcio, una asociada a suero fisiológico y otra a paramonoclorofenol alcanforado, sobre microorganismos facultativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis*) en períodos de 24 y 48 horas, a través de un método de difusión en agar. Los resultados demostraron que las dos medicaciones fueron efectivas sobre todos los microorganismos analizados en 24 y 48 horas. La medicación que contenía hidróxido de calcio con PMCFA mostró un mayor halo de inhibición de crecimiento. Los autores creen que este hecho ocurrió debido a la dificultad de difusión de los iones hidroxilos de la medicación de hidróxido de calcio con suero fisiológico en el agar (Estrela et al, 1997).

Biral et al (1982), estudiaron comparativamente la actividad antimicrobiana del paramonoclorofenol alcanforado, de la solución de yoduro de potasio yodado al 2% y del formocresol. Observaron que, en las pruebas de acción indirecta, a través de vapores, en condiciones clínicas simuladas sobre algunas bacterias (entre ellas el *Enterococcus faecalis*), el paramonoclorofenol alcanforado fue ineficaz, siendo su actividad evidenciada sólo ante la *Pseudomonas aeruginosa*. La prueba de difusibilidad a través de la dentina mostró que el paramonoclorofenol alcanforado no registró una adecuada capacidad de penetración. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Miranda (1969), quien señaló que el *E. faecalis* y otros microorganismos se mostraron resistentes a agentes medicamentosos como antibióticos, detergentes y paramonoclorofenol alcanforado (Estrela et al, 1997).

Otros trabajos afirman que el paramonoclorofenol alcanforado es ineficaz por acción indirecta a través de vapores, con ausencia de acción a distancia, actuando más por contacto directo (Kuroda, 1926; Cwikla, 1972; Vantulok & Brown, 1972; Souza et al, 1978; citados en Estrela, 1997).

Según Sukawat y Srisuwan (2002), el hidróxido de calcio diluido en paramonoclorofenol alcanforado es más efectivo contra *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios que el hidróxido de calcio mezclado con agua destilada o con clorhexidina al 0.2%.

Barbosa et al (1997), compararon in vitro la actividad antimicrobiana de la clorhexidina, hidróxido de calcio y PMCFA, no siendo su diferencia significativamente estadística, aunque el PMCFA demostró ser el más efectivo frente a la microbiota intraconducto.

8.2. CITOTOXICIDAD

Harrison & Madonia (1971), comparando la toxicidad de concentraciones reducidas de paramonoclorofenol acuoso con paramonoclorofenol alcanforado, concluyeron que el acuoso provoca respuesta inflamatoria bastante moderada, mientras el alcanforado es altamente tóxico, siendo capaz de provocar necrosis residual. Además de este hecho, la penetración del acuoso es mayor que la del alcanforado. Otros trabajos también confirmaron la toxicidad de este medicamento (Holland et al, 1969, 1978; Spangberg et al, 1973, 1979; Martins et al, 1979; Fager & Messer, 1986; Soekanto et al, 1996; Estrela, 1997; Llamas et al, 1997).

Llamas y cols, evaluaron en ratas el efecto in vitro del PMCF y el PMCF alcanforado sobre los macrófagos y demostraron que estos compuestos disminuyeron significativamente la capacidad de adhesión de macrófagos al sustrato. Tomando en cuenta que la adhesión es el primer paso de la fagocitosis por parte de macrófagos además de la presentación del antígeno, tanto el PMCF como el PMCF alcanforado pueden inhibir la función del macrófago y modular la respuesta inflamatoria e inmune en los tejidos periapicales. Por lo tanto, cuando son usados intraconducto, pueden retardar los procesos reparativos. Tal vez, estos medicamentos sólo deban ser usados en tratamientos de conductos de dientes con pulpas necróticas (Llamas et al, 1997).

También, se ha demostrado en células humanas in Vitro, que el PMCFA inhibe la viabilidad y proliferación de las células del ligamento periodontal, por lo tanto, se sugiere no utilizarlo como medicación intraconducto cuando se esté considerando un procedimiento quirúrgico periodontal, especialmente si se está intentando algún procedimiento de regeneración o nueva inserción de los tejidos adyacentes al diente involucrado endodónticamente (Llamas et al, 1997).

Kantz y cols., evaluaron el efecto tóxico del PMCFA, acetato de metacresilo (cresatina) y del cloruro de benzalconio (acrifén) en distintas diluciones, sobre las células de cultivo tisular. Se demostró que las 3 drogas fueron tóxicas aún en concentraciones de 1:1.000, aunque el acrifén fue el menos tóxico. Sólo en la dilución de 1:100.000 a las 12 y 48 horas la toxicidad no fue significativa (Bóveda, 2004).

En un estudio in vivo e in vitro realizado por Spangberg et al, se evaluó el efecto sobre la irritación tisular (permeabilidad capilar) y la citotoxicidad de varios medicamentos: PCMFA, cresatina, yoduro de potasio yodado y formocresol; concluyendo que el PMCFA es el antiséptico más tóxico e irritante, seguido de la cresatina; y el menos tóxico fue el yoduro de potasio yodado (Bóveda, 2004).

Leonardo y Holland, encontraron que los tejidos periapicales tienen buena respuesta al hidróxido de calcio mezclado con PMCFA. Ellos explicaron que el paramonoclorofenolato de calcio libera lentamente el paramonoclorofenolato y su concentración no es suficiente para destruir el tejido (Sukawat y Srisuwan, 2002).

Ribeiro et al., (2004) examinaron el potencial genotóxico del formocresol, PMCFA e hidróxido de calcio, usando células de mamífero. Los resultados demostraron que todos los compuestos evaluados no causaron daño al DNA al momento del análisis.

9. SUERO FISIOLÓGICO

Solución salina al 0.9 %, denominada Suero Fisiológico, es una sustancia cristaloides estándar, constituida por 9grs de cristales de cloruro de sodio en 1000cc de agua destilada en la que la relación de concentración de sodio (Na⁺) y de cloro (Cl⁻) es 1:1. En concentración isotónica, la solución salina no produce daños conocidos en el tejido. Debido a esto, ha sido recomendado por algunos investigadores, como un líquido irrigador que minimiza la irritación, la inflamación de los tejidos y expele detritus de los conductos con tanta eficacia como el hipoclorito de sodio (Lasala, 1992). Produce gran debridamiento y lubricación. Esta solución es susceptible de contaminarse con materiales biológicos extraños por una manipulación incorrecta antes, durante y después de utilizarla.

La irrigación con solución salina no permite la destrucción química de la materia microbiológica y la disolución de los tejidos mecánicamente inaccesibles. La solución salina isotónica es demasiado débil para limpiar los conductos eficazmente (Cohen, 1999). Algunos autores concluyen que el volumen es más importante que el tipo de irrigante, y recomiendan el uso de una solución compatible biológicamente como la solución salina, pero ésta tiene poco o ningún efecto químico y depende solamente de su acción mecánica, para remover materiales del conducto radicular. En general esta sustancia es la más biocompatible con el tejido entre las soluciones de irrigación (Foreman y Barnes, 1990).

El suero fisiológico también es utilizado como vehículo del hidróxido de calcio en la medicación intraconducto. No posee efecto antibacteriano y presenta mínima disolución de tejido, lo que permite que las propiedades antimicrobianas del hidróxido de calcio no sean potenciadas por la acción del suero.

De acuerdo a la literatura Anthony et al, 1982; Fava y Saunders, 1999; Gomez, 2003), la mayoría de los autores señalan que el hidróxido de calcio en vehículo de suero fisiológico o agua destilada, cuando se compara con hidróxido de calcio en vehículos con propiedades antimicrobianas, resulta ser menos efectivo contra *E.faecalis*. Sin embargo, cuando se compara con un grupo control (sin medicación), éste muestra efectividad antimicrobiana manifestada en una reducción en el número de colonias.

II. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H_0): Existe diferencia en la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis*, al usar diferentes vehículos (Suero, PMCFA, Clorhexidina 2%, PMCFA + Clorhexidina 2%).

Hipótesis Alternativa (H_1): No existe diferencia en la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis*, al usar diferentes vehículos (Suero, PMCFA, Clorhexidina 2%, PMCFA + Clorhexidina 2%).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la eficacia antimicrobiana del Hidróxido de Calcio en cuatro diferentes vehículos frente al *Enterococcus faecalis*.

Objetivos específicos

Determinar si existe diferencia entre los diferentes vehículos del Hidróxido de Calcio, al evaluar la eficacia antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*.

Determinar cuál es el vehículo más eficiente frente al *Enterococcus faecalis*.

Determinar cuál es el vehículo menos eficiente frente al *Enterococcus faecalis*.

Determinar la eficacia de la combinación de Paramonoclorofenol alcanforado + Clorhexidina 2% frente al *Enterococcus faecalis*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio Experimental in vitro, sobre un universo de 188 dientes extraídos, recolectados desde diferentes clínicas dentales durante los meses de octubre de 2005 a abril de 2006. Según criterios de inclusión: dientes unirradicados, corona completa, raíces rectas, ápices completamente formados y sin tratamiento endodóntico previo, se obtuvo una muestra de 72 dientes. Durante la etapa de preparación de la muestra 12 dientes fueron excluidos por fracturas, conductos esclerosados y doble conductos. Se obtuvo una muestra final de 60 dientes.

Preparación de la muestra

Esta etapa fue realizada en las dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Los 188 dientes recolectados fueron almacenados en agua oxigenada. Los 72 dientes seleccionados fueron hidratados en suero fisiológico por una semana y desinfectados con hipoclorito de sodio al 2.5 %. Posteriormente fueron rotulados al azar del 1 al 72 y medidos con una regla metálica milimetrada, desde el punto de referencia coronario al ápice, obteniendo la longitud real del diente a la que se le restó 1mm para determinar la longitud de trabajo. Este valor fue anotado en una tabla (imagen n°1).



Imagen n° 1: Medición longitud dentaria.

Los 72 dientes se montaron en una base acrílica. Se utilizó un cilindro de cobre de 1cm de diámetro por 2.5 cm de alto el que fue recubierto en las paredes internas con vaselina líquida y colocado sobre una loseta de vidrio. Se preparó acrílico transparente de autocurado y en estado líquido se llevó mediante una espátula, al interior del cilindro (imagen n°2). En estado plástico se posicionaron los dientes (imagen n°3). Antes de finalizar la polimerización del acrílico se desmontaron los cilindros obteniendo las unidades de estudio (imagen n° 4). Previamente se comprobó la resistencia del acrílico transparente de autocurado al proceso de esterilización en autoclave al que serán sometidas las unidades de estudio montadas en los cilindros.



Imagen n°2: Colocación de acrílico.



Imagen n°3: Montaje de diente.



Imagen n°4: Desmontaje de cilindro.

Los 72 dientes fueron preparados con instrumentación manual según la técnica para conductos aparentemente rectos de la Universidad de Valparaíso. La apertura coronaria se realizó con piedras de diamante redondas estériles, a alta velocidad (imagen n°5). Se exploró el conducto con una lima estéril K n° 10 Dentsply –Maillefer® para permeabilizar el conducto y desde el punto de referencia, ayudado por un tope de silicona, medir la lima con una regla metálica milimetrada para verificar la longitud de trabajo definitiva (imágenes n° 6 y 7).



Imagen n°5: Apertura coronaria.

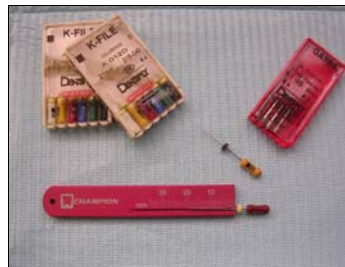


Imagen n°6: Medición de longitud.



Imagen n°7: Control de longitud.

Se preparó los 2/3 coronarios con fresas estériles Gates Glidden Dentsply –Maillefer® de las medidas 1, 2 y 3, usadas en el orden 1-3-2-1. El tercio apical fue preparado a longitud de trabajo hasta la MAF correspondiente a cada diente, irrigando con jeringas desechables de 5ml y agujas de calibre 27 G con suero y secando el conducto con conos de papel y motas estériles, según MAF de cada diente (imágenes n° 8 y 9).

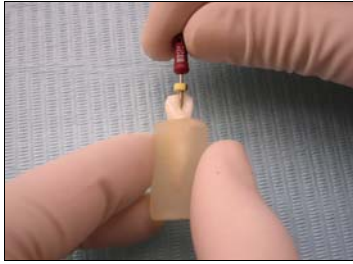


Imagen n°8: Preparación biomecánica.

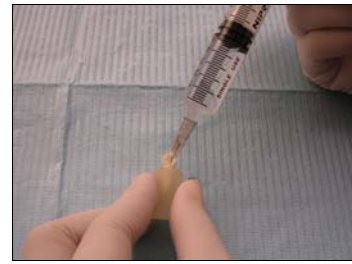


Imagen n°9: Irrigación con suero.

Al finalizar este proceso 12 dientes fueron excluidos por fracturas, conductos esclerosados y doble conducto. Se obtuvo una muestra final de 60 dientes los que fueron nuevamente rotulados.

Etapa de Laboratorio

Esta etapa fue realizada en el Laboratorio Pasteur del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Todos los procedimientos efectuados en este laboratorio, fueron realizados en un ambiente aséptico obtenido mediante la desinfección del campo operatorio con alcohol 90° y la utilización de tres mecheros Bunsen.

Etapa de preparación al experimento

Se utilizaron 260 placas Petri de 80 x 15mm y 350 tubos de ensayo de 18ml. Éstos fueron lavados con detergente, enjuagados dos veces en agua corriente y una última vez en agua destilada. Posteriormente fueron secados en un horno, empaquetados y esterilizados (imágenes n°10,11y 12).



Imagen n°10: Lavado.



Imagen n°11: Secado de placas Petri.



Imagen n°12: Esterilización.

Se preparó suero fisiológico utilizando 1000ml de agua destilada para 9 grs de cristales de cloruro de sodio en matraces, los que fueron esterilizados. Parte de este suero se dividió en 60 tubos de ensayos de 7 ml que fueron llenados con 1 ml de suero y 240 tubos de ensayo de 18 ml que fueron llenados con 9 ml cada uno para realizar método de dilución.

Se adquirieron los siguientes medios de cultivo: infusión cerebro-corazón (calf brain 200 gr/ lt, beef heart 250 gr/ lt, protease peptone 10 gr/ lt, dextrose 2 gr/lt, sodium chloride 5 gr/lt, disodium phosphate 2.5 gr/ lt) y agar cerebro-corazón (agar 15 gr/ lt, calf brain 200 gr/ lt, beef heart 250 gr/ lt, protease peptone 10 gr/ lt, dextrose 2 gr/lt, sodium chloride 5 gr/lt, disodium phosphate 2.5 gr/ lt) marca Hi-Media. El agar fue preparado en matraces de acuerdo a las instrucciones del fabricante y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos (imágenes n°13 y 14). Posteriormente el agar fue vertido en cada una de las placas Petri, las que fueron deshumedecidas en la cámara de cultivo por 40 minutos (imagen n°15). La infusión fue preparada en matraces de acuerdo a las instrucciones del fabricante, vertida en 6 tubos de ensayo de 7ml y esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos.



Imagen n°13: Preparación de agar.



Imagen n°14: Esterilización.



Imagen n°15: Llenado de placas.

Se adquirió al ISP, cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Cultive Collection), mediante un formulario de solicitud y autorización sanitaria. La cepa pura de *E. faecalis* fue cultivada durante 18 horas en Agar cerebro-corazón Hi-Media dentro de una cámara de cultivo a 37 °C. Con el fin de comprobar la presencia exclusiva de *E. faecalis* en el cultivo, se realizó Tinción de Gram (imágenes n°16 y 17).

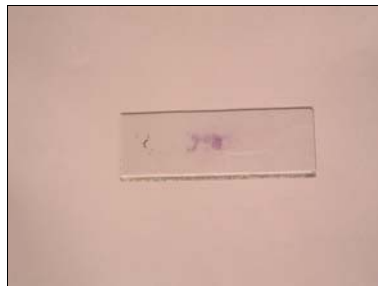


Imagen n°16: Tinción de gram



Imagen n°17: Observación en microscopio.

Posteriormente se inoculó tres unidades formadoras de colonias (CFU) en glicerol al 10% a -81°C, con el fin de conservar la cepa por el período de un año, para lo cual se utilizó un congelador ubicado en el Departamento de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Se sembró 1 tubo de ensayo con 15 ml de Infusión cerebro- corazón, con 1 CFU obtenida del cultivo anterior (imagen n° 18). El tubo fue llevado a una cámara de cultivo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó dilución, siembra en agar cerebro corazón, incubación por 24 hrs y recuento de CFU. (3.700.000 CFU / 1ml) (imagen n° 19 y 20).



Imagen n°18: *E. faecalis* en agar.

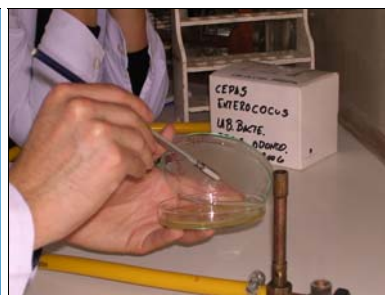


Imagen n°19: Siembra de dilución en agar.

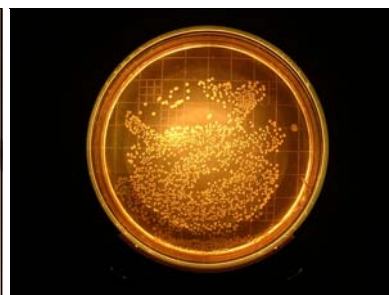


Imagen n°20: Recuento de CFU.

Etapa Experimental

Los 60 dientes montados en la base acrílica fueron esterilizados en autoclave a 121° C por 20 minutos a 1.5 atm (imagen n° 21).

Cada conducto fue inoculado por 25 segundos con un cono de papel estéril n° 30 embebido en 0,1 ml de cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, que fue cultivada previamente en infusión cerebro-corazón y posteriormente sellados con mota de algodón estéril y ionoseal®. Éstos fueron incubados en cámara de cultivo a 37°C por 48 hrs (imágenes n° 22, 23, 24 y 25).

Mediante una tabla de números aleatorios, los dientes inoculados fueron asignados al azar a cada grupo experimental, utilizando método doble ciego.



Imagen n° 21: Dientes esterilizados (envueltos en papel Kraft) junto a campo operatorio.



Imagen n° 22: Cono de papel embebido en cepa de E. faecalis.



Imagen n° 23: Inoculación de cepa de E. faecalis en diente.



Imagen n° 24: Sellado con Ionoseal®.



Imagen n° 25: Cámara de cultivo.

Transcurridas 48 hrs en la cámara de cultivo, los 60 dientes fueron llevados al laboratorio donde fue retirado el sellado. Cada grupo fue medicado ayudado por una lima K de acuerdo a la MAF de cada diente a longitud de trabajo, con hidróxido de calcio en diferentes vehículos. Las medicaciones fueron preparadas por un solo operador, sobre una loseta de vidrio estéril en consistencia de pasta dental (imágenes n° 26, 27, 28, 29 y 30).



Imagen n° 26: Suero fisiológico estéril al 0.9%.



Imagen n° 27: Medicamentos utilizados.



Imagen n° 28: Preparación de la medicación (consistencia de pasta dental)

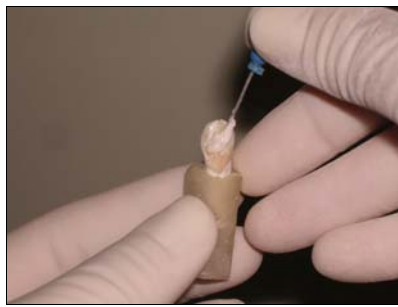


Imagen n° 29: Aplicación de la medicación al conducto.



Imagen n° 30: Aplicación de la medicación al conducto.

- Grupo 1: hidróxido de calcio en un vehículo de suero fisiológico.
- Grupo 2: hidróxido de calcio en un vehículo de Oralgene ® 2 %.
- Grupo 3: hidróxido de calcio en un vehículo de Paramonoclorofenol Alcanforado.
- Grupo 4: hidróxido de calcio en un vehículo de Paramonoclorofenol Alcanforado + Oralgene ® 2%.

Posteriormente, se realizó un doble sellado cameral con una mota de algodón estéril, Ionoseal ® y Fermin ® (imágenes n° 31, 32 y 33).



Imagen n° 31: Instrumental estéril para aplicación de sellado.



Imagen n° 32: Aplicación de Ionoseal®.



Imagen n° 33: Colocación de Fermin®.

Posteriormente fueron cultivados en una cámara de cultivo a 37° C durante 10 días (imagen n° 34).



Imagen n° 34: Dientes sellados para llevar a cámara de cultivo.

Se retiró el sellado con fresa de carbide estéril a baja velocidad, se eliminó la medicación irrigando con 10 ml de suero fisiológico ayudado de una lima K n° 20 a longitud de trabajo. Se secó con motas de algodón y conos de papel estériles. Se obtuvo una muestra de cada conducto con un cono de papel estéril n° 30 por 25 segundos. Se depositó en 1 ml de suero fisiológico y posteriormente fue agitado en Vortex Mixer (imágenes n° 35, 36, 37, 38 y 39).

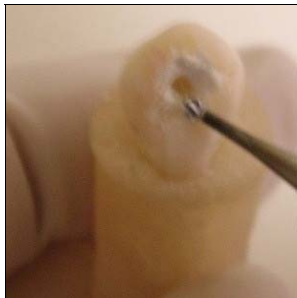


Imagen n° 35: retiro sellado.



Imagen n° 36: Irrigación con suero estéril (retiro de la medicación).



Imagen n° 37: Secado y toma de muestra con cono estéril n° 30.



Imagen n° 38: Colocación de cono en tubo con 1ml de suero fisiológico estéril.



Imagen n° 39: Agitación de tubo en Vortex.

Para cada unidad de estudio se realizó método de dilución con cuatro tubos de ensayo con 9 ml de suero fisiológico estéril cada uno, todas estas agitadas en Vortex Mixer (imagen n°40).

Cada dilución fue sembrada en placas Petri con agar cerebro-corazón (rotuladas con el número correspondiente a cada diente y la concentración de la dilución) e incubadas por 24 hrs en la cámara de cultivo a 37°C (imágenes n° 41 y 42).



Imagen n° 40: Método de dilución.

Imagen n° 41: Sembrado de las diluciones.

Imagen n° 42: Incubación en cámara de cultivo.

Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de cada una de las unidades formadoras de colonias (CFU) a las 24 hrs, utilizando la *unidad contadora de colonias de Québec* (imágenes n° 43 y 44). El número de CFU obtenidas en cada una de las cuatro diluciones correspondientes a cada diente, fue promediado para obtener un único valor por unidad de estudio. Los datos obtenidos del recuento de colonias fueron registrados para efectuar el análisis estadístico.

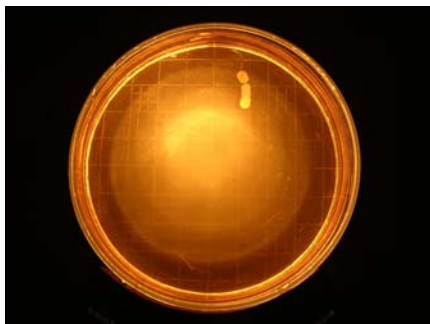


Imagen n° 43: Recuento de colonias (CFU).



Imagen n° 44: Recuento de colonias (CFU).

Análisis de datos

Los datos fueron tabulados y analizados mediante el programa estadístico Stat Graphics 5.1 y Microsoft Office Excel versión 2007 (Beta). Se obtuvo tablas estadísticas descriptivas para cada grupo. Éstos fueron comparados mediante el análisis de la varianza (ANOVA), Contraste Múltiple de Rango y Test de Kruskal-Wallis. El test ANOVA fue escogido porque permite comparar más de dos grupos, en base a muestras independientes. El test de Contraste Múltiple de Rango se utilizó para determinar entre que pares de grupos existe diferencia estadísticamente significativa. El test de Kruskal-Wallis fue utilizado para probar la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada uno de los grupos. Para la realización de estos análisis, se fijó un nivel de significancia en 0,05. Con el fin de otorgar mayor validez a nuestro estudio, se realizó Contraste de Varianza, en el cual se comparó con otros tests.

V. RESULTADOS

La siguiente tabla constituye la base de datos, en ella se identifica cada diente con número al que fue designado aleatoriamente un vehículo del hidróxido de calcio. La cantidad de colonias observadas se registra como CFU (Tabla II).

grupo 1		grupo 2		grupo 3		grupo 4	
HIDRÓXIDO DE CALCIO + SUERO		HIDRÓXIDO DE CALCIO + CLORHEXIDINA		HIDRÓXIDO DE CALCIO + PMCFA		HIDRÓX. DE CALCIO+PMCFA+CLORHEXIDINA	
n° diente	CFU	n° diente	CFU	n° diente	CFU	n° diente	CFU
5	70	2	0	1	10	9	165
6	0	3	0	7	65	11	10
10	20	4	0	14	10	15	10
13	10	8	10	16	0	18	30
17	10	12	0	20	0	19	10
25	20	21	65	22	0	23	130
28	0	30	10	24	10	27	55
29	10	34	60	26	0	31	85
33	0	36	0	32	10	38	50
37	20	39	0	35	0	40	10
44	100	41	0	42	10	43	10
47	10	48	0	46	10	45	30
49	10	54	10	50	65	51	0
55	0	57	10	52	60	56	20
60	105	58	10	53	10	59	195

TABLA II: Base de datos

La muestra (n=60) fue dividida en cuatro grupos de 15 dientes cada uno.

Estadísticos descriptivos	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4
Media	25,7	11,7	17,3	54
Error típico	9,2	5,5	6,3	16
Mediana	10	0	10	30
Moda	10	0	10	10
Desviación estándar	35,60	21,19	24,27	62,03
Varianza de la muestra	1267,38	448,81	588,81	3847,14
Curtosis	1,43	3,70	0,70	0,76
Coefficiente de asimetría	1,66	2,18	1,53	1,38
Rango	105	65	65	195
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	105	65	65	195
Suma	385	175	260	810
Cuenta	15	15	15	15

TABLA III: Estadística descriptiva

En relación a la tabla de estadísticos descriptivos (Tabla III), podemos señalar que el grupo dos (HC en vehículo de clorhexidina) es el que presenta en promedio el menor número de colonias, siendo este estadístico muy similar al del grupo 3 (HC en vehículo de PMCFA), sin embargo, se puede afirmar que es mejor vehículo que el grupo 3 puesto que la mediana con valor cero, refleja que el grupo 2 en el 50% de las observaciones no se forman colonias.

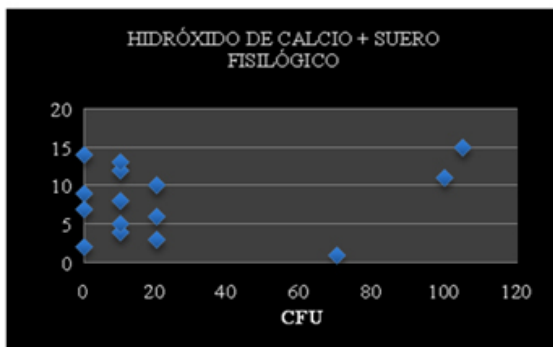


Gráfico n° 1: G. Dispersión HC + suero

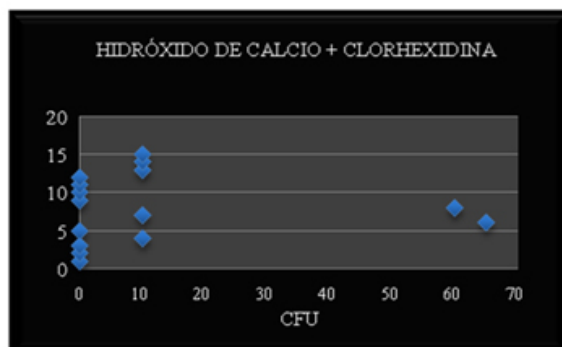


Gráfico n° 2: G. Dispersión HC+ clorhexidina

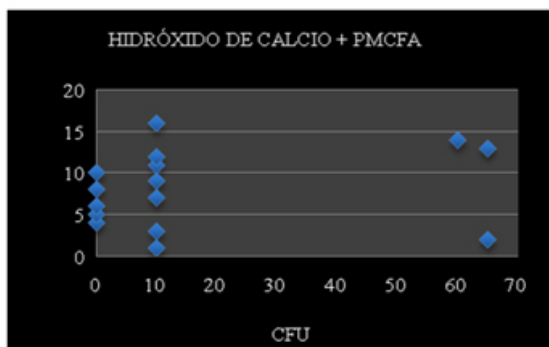


Gráfico n°3: G. Dispersión HC+ PMCFA

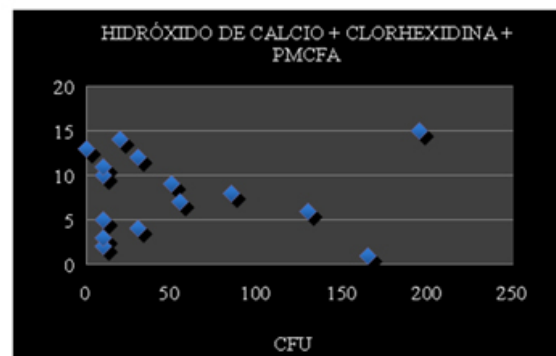


Gráfico n°4: G. Dispersión HC+ clorhexidina +PMCFA

De acuerdo a los gráficos (1, 2, 3 y 4), son los grupos 2 y 3 los que presentan menor dispersión entre sus observaciones (desviaciones estándar y rango), en tanto que el grupo 4 es el de mayor variabilidad, es decir en este último grupo se observan dientes que forman muchas y otros muy pocas colonias

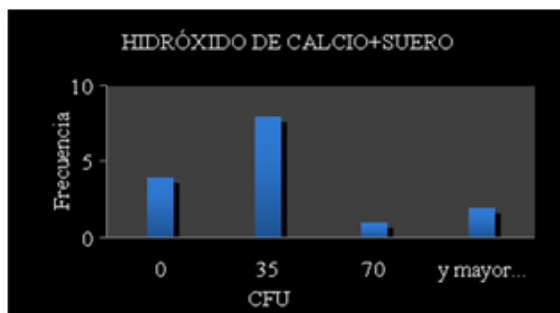


Gráfico n°5: Histograma HC + suero.

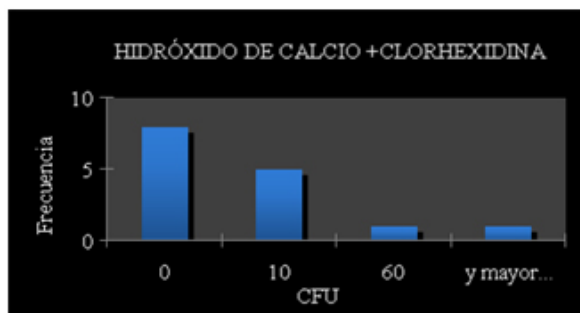


Gráfico n° 6: Histograma HC+ clorhexidina.

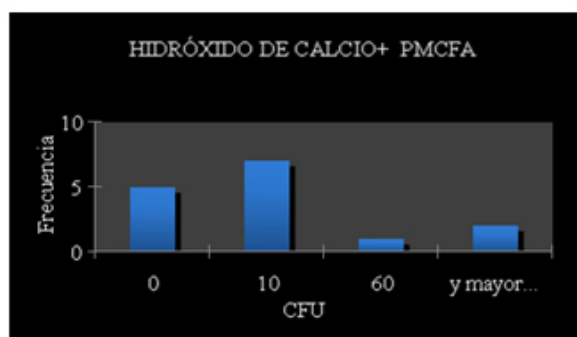


Gráfico n° 7: Histograma HC+ PMCFA.

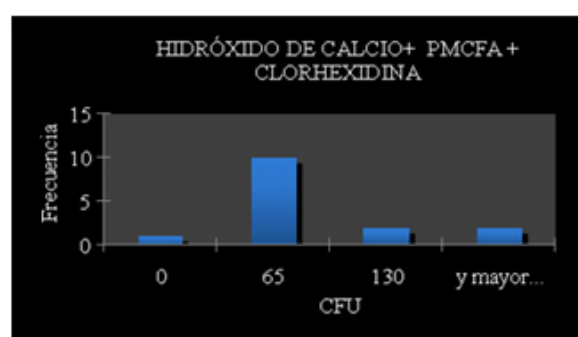


Gráfico n° 8: Histograma HC+ PMCFA+ Clorhexidina.

De acuerdo a los gráficos 5, 6, 7 y 8, son los grupos 2 y 3 (HC en vehículo de clorhexidina y HC en vehículo de PMCFA) los que presentan una mayor frecuencia de recuento de CFU igual a cero, en tanto los grupos 1 y 4 (HC en vehículo de suero fisiológico y HC en vehículo de PMCFA más clorhexidina).

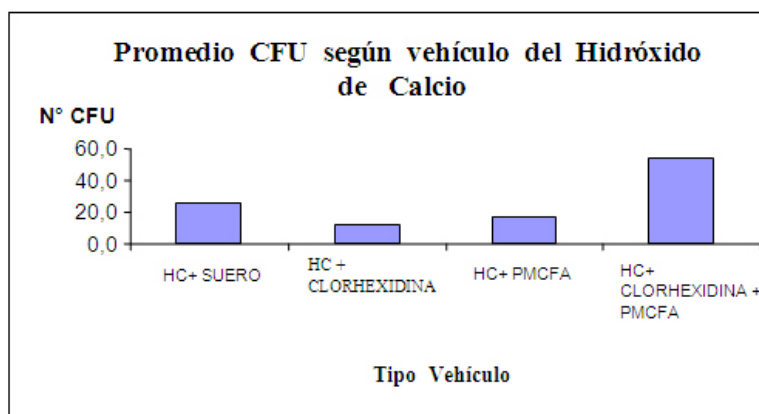


Gráfico n° 9: Promedio de CFU según vehículo.

El gráfico n°9 muestra que el hidróxido de calcio en vehículo de PMCFA más Clorhexidina es el que forma en promedio mayor número de colonias (54), mientras que el HC en Clorhexidina es el más efectivo de los cuatro grupos al desarrollar en promedio menor número de colonias (11,7).

GRÁFICO DE CAJAS Y BIGOTES

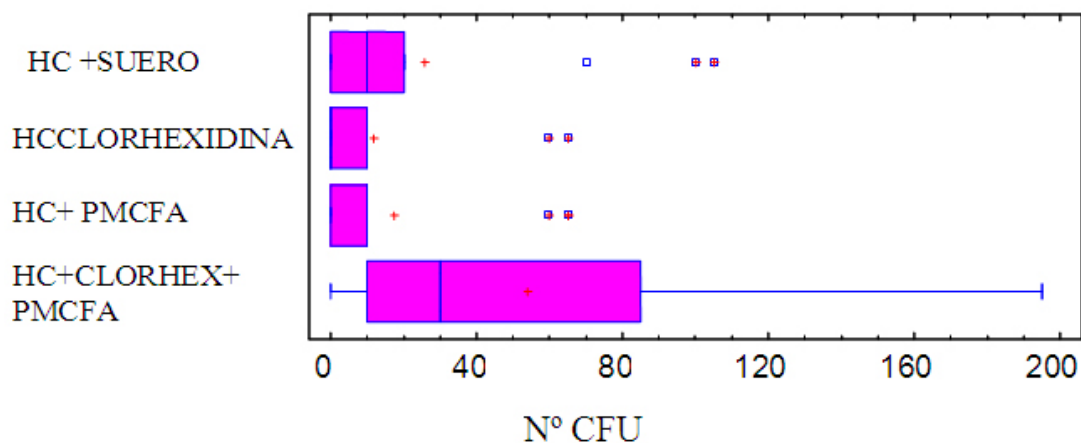


Gráfico n° 10: Cajas y Bigotes.

El Gráfico n°10 nos muestra la distribución de las observaciones entre los diferentes grupos, resultando ser los vehículos de Clorhexidina y PMCFA los más homogéneos, con dos datos atípicos en cada uno de ellos. Resulta evidente la heterogeneidad de los datos del grupo 4 ya que el 50% de las observaciones se presentan en un rango muy amplio (caja), mayor variabilidad entre los datos.

De acuerdo a la tabla III (Estadística descriptiva), los valores de curtosis y coeficiente de asimetría confirman que los datos observados corresponden a una distribución normal y por consiguiente es posible realizar pruebas paramétricas.

Análisis de la Varianza de una vía.

Es el test estadístico indicado cuando se requiere comparar si las medias entre grupos (más de dos) son iguales, en base a muestras independientes.

Análisis de la Varianza					
FUENTE	SUMA DE CUAD.	GL	CUADRADO MEDIO	COECIENTE-F	p-VALOR
Entre Grupos	15888,3	3	5296,11	3,44	0,0227
Intra Grupos	86130,0	56	1538,04		
Total (Corr.)	102018,0	59			

TABLA IV: *Tabla ANOVA.*

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 3,44343, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F (0,0227) es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

Test Kruskal-Wallis

	Tamaño Muestral	Rango Medio
HCSUERO	15	32,0
HCCLORHEXIDINA	15	21,6667
HCPMCFA	15	27,1667
CLOREXPMCF A	15	41,1667

Estadístico = 10,9269 P-valor = 0,0121272

TABLA V: Test de Kruskal-Wallis

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de las medianas dentro de cada una de las 4 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95.0 Porcentaje LSD

	Frecuencia	Media	Gr. Homogeneos
HCCLORHEXIDINA	15	11,6667	X
HCMPCFA	15	17,3333	X
HCSUERO	15	25,6667	XX
CLORHEXPMCF A	15	54,0000	X

Contraste	Diferencias	+/- Limite
HCSUERO - HCCLORHEXIDINA	14,0000	28,6871
HCSUERO - HCPMCFA	8,33333	28,6871
HCSUERO - CLORHEXPMCF A	-28,3333	28,6871
HCCLORHEXIDINA - HCPMCFA	-5,66667	28,6871
HCCLORHEXIDINA - CLORHEXPMCF A	*-42,3333	28,6871
HCPMCFA - CLORHEXPMCF A	* -36,6667	28,6871

* Indica una diferencia significativa

TABLA VI: Contraste Múltiple de Rango

La tabla VI aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo **X** en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

En resumen al comparar entre pares de grupos existen diferencias significativas entre clorexidina y clorexidina + PMCFA, así como también entre PMCFA y clorexidina + PMCFA.

Contraste de Varianza

Contraste C de Cochran: 0,625334 P-valor = 0,0000935434

Contraste de Bartlett: 1,4436 P-valor = 0,000172561

Test de Levene: 2,68547 P-valor = 0,055215

El cuarto estadístico mostrado, comprueba la hipótesis nula de que la desviación típica dentro de cada una de las 3 columnas es la misma. De particular interés están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Esto infringe una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de los tests estadísticos estándar.

VI. DISCUSIÓN

La desinfección del sistema de conductos radiculares es crucial en la terapia endodóntica. Dado que el rol de las bacterias residuales en los túbulos dentinarios y su potencial efecto sobre el resultado a largo plazo de la terapia endodóntica es un tópico importante de discusión, la desinfección de la dentina radicular es una meta clínica deseable (Basrani et al, 2004). La literatura indica que la instrumentación quimiomecánica sola no es suficiente para lograr la desinfección del conducto radicular, por lo tanto, la medicación intracanal es requerida para otorgar la desinfección.

El *Enterococcus faecalis* fue elegido en este estudio, porque ha sido encontrado en conductos radiculares infectados e indicado como factor etiológico de infecciones persistentes y tratamientos endodónticos fallidos. Es de fácil mantención y cultivo en laboratorio, por lo que ha sido usado satisfactoriamente en estudios previos.

Elegimos en este estudio el hidróxido de calcio como medicación intracanal, porque es la medicación más utilizada actualmente y por la controversia que existe en la literatura acerca de su eficacia frente al *Enterococcus faecalis*.

La mayoría de las bacterias patogénicas en humanos no son capaces de sobrevivir en un medio extremadamente alcalino. Sin embargo, una de las más resistentes es el *Enterococcus faecalis*, pudiendo sobrevivir en pH 11,5, sensibilizándose al pH 12 del hidróxido de calcio (Rocas et al., 2004).

Utilizamos clorhexidina al 2% como uno de los vehículos del hidróxido de calcio porque ha sido usada como antiséptico en pacientes periodontales y como irrigante en tratamientos de conductos radiculares, posee un amplio espectro antibacteriano, activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, es absorbida por la hidroxiapatita y membranas mucosas, con liberación gradual y prolongada, siendo incluso en altas concentraciones biocompatible (Bascones y Manso, 1994).

Elegimos PMCFA, como vehículo del hidróxido de calcio, puesto que varios estudios han demostrado su efecto bactericida sobre *E.faecalis* y ha sido utilizado clínicamente durante largo tiempo (Bystrom et al, 1985).

Decidimos ocupar suero fisiológico como vehículo del hidróxido de calcio porque esta sustancia es biocompatible con los tejidos (Foreman y Barnes, 1990). Sin embargo, su efecto antibacteriano y su capacidad de disolución de tejido es mínima, lo que nos permitió evaluar las propiedades antimicrobianas del hidróxido de calcio sin ser potenciado por la acción del vehículo.

Como una forma de evaluar el efecto antimicrobiano sinérgico o aditivo de dos vehículos, decidimos usar clorhexidina 2% junto a paramonoclorofenol alcanforado como vehículo del hidróxido de calcio, puesto que en forma independiente, ambos presentan efectividad antimicrobiana contra el *E. faecalis*.

Los resultados de nuestro estudio, demuestran que el hidróxido de calcio en vehículo de clorhexidina 2% es el que presenta en promedio el menor número de CFU (11,7), siendo este resultado muy similar al hidróxido de calcio en vehículo de paramonoclorofenol alcanforado (17,3). Por otro lado, ambos vehículos resultaron ser más eficaces que el suero fisiológico, el que mostró un promedio de CFU mayor (25,7); a diferencia, el hidróxido de calcio en vehículo de PMCFA más clorhexidina 2%, es el que forma en promedio mayor número de colonias (54). Podemos afirmar que la clorhexidina 2% es mejor vehículo que el paramonoclorofenol alcanforado, suero fisiológico y clorhexidina 2% más PMCFA, puesto que en el 50% de las observaciones no se formaron colonias. Esto es posible, debido a que los vehículos con los cuales es mezclado el hidróxido de calcio, afectan sus propiedades y por lo tanto sus aplicaciones clínicas y efectividad (Fava y Saunders, 1999). Al respecto, la clorhexidina presenta un amplio espectro antimicrobiano y extendida actividad residual, lo que potencia el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio otorgado por su alto ph. En relación a paramonoclorofenol alcanforado, a pesar que posee un gran poder antibacteriano en sí mismo, mezclado con hidróxido de calcio, la sal paramonoclorofenolato de calcio libera paramonoclorofenolato y OH-, ambas bactericidas. Su volatilidad hace perder rápidamente su efectividad antimicrobiana pasadas las 24 hrs, lo que podría explicar un mayor recuento de CFU respecto a clorhexidina al 2%, la cual presenta sustentividad de 48 a 72 hrs. Vehículos acuosos comúnmente usados con hidróxido de calcio, tales como suero fisiológico o solución anestésica, no parecen afectar significativamente el pH del hidróxido de calcio (Anthony et al., 1982; Stamos et al., 1985), lo que explicaría los resultados encontrados en este estudio de un mayor número de CFU en comparación a clorhexidina 2% y PMCFA, ya que la eficacia antimicrobiana está dada solamente por la acción del hidróxido de calcio y no por el sinergismo otorgado por el vehículo. La medicación formada por hidróxido de calcio en vehículo de clorhexidina al 2% más PMCFA, no arrojó el efecto aditivo esperado, por el contrario, fue la medicación que presentó el mayor número de CFU (54). Debido a que no existen estudios al respecto, los resultados no son comparables, sin embargo, estos pueden explicarse, ya que a pesar que ambos vehículos son eficaces antimicrobianos en forma individual, podrían tener algún efecto negativo en conjunto, por algún fenómeno de tipo químico, el cuál desconocemos, que alteraría los componentes de esta medicación.

Varios estudios realizados en dentina, demuestran que la clorhexidina, en concentraciones de 1 a 2 % combinada con hidróxido de calcio, tiene eficacia demostrada para destruir *Enterococcus faecalis* (Stuart et al., 2006). Schaefer et al., (2005) compararon el efecto contra el *E. faecalis* de ambos medicamentos y avalaron al hidróxido de calcio, en comparación con clorhexidina al 2%, como el que poseen mejor efecto antibacteriano, y aumentado aún más al combinar hidróxido de calcio con clorhexidina al 2%. (Schaefer y Bossmann, 2005). Nageshwar et al., (2004), demostraron el sinergismo resultante de la mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina, siendo ésta más eficaz que la medicación de hidróxido de calcio solo. En un estudio realizado por Gomes B et al., (2006), se demuestra que la clorhexidina al 2% combinada con hidróxido de calcio, posee mayor habilidad para

destruir *Enterococcus faecalis* que el hidróxido de calcio mezclado con agua (Gomez et al, 2003). En concordancia con estos autores, nuestro estudio muestra que el hidróxido de calcio combinado con clorhexidina al 2%, tiene mayor poder antimicrobiano frente al *E. faecalis*, que el hidróxido de calcio con suero fisiológico.

Lin et al., (2003) en un estudio realizado en placas de agar, demostraron que la combinación de hidróxido de calcio y clorhexidina, muestra mejor efecto antibacteriano que el hidróxido de calcio solo, pero esta combinación no revela significativamente mejor efecto antimicrobiano que la clorhexidina sola como medicación frente a *E. faecalis*. A pesar de que la metodología de este estudio difiere del nuestro, ya que éste fue realizado por difusión en placas de agar, los resultados concuerdan. Basrani et al., (2003) han sugerido que el hidróxido de calcio tiene pobre eficacia frente al *E. faecalis* sobre placas de agar, por su menor difusión o por el efecto buffer de éste, lo que puede traducirse en una baja del pH del hidróxido de calcio.

En contraste, otros estudios, como el realizado por Lynne et al., (2003) demuestran que el hidróxido de calcio al 10%, tiene un efecto antimicrobiano significativo contra el *Enterococcus faecalis* en túbulos dentinarios y puede ser más efectivo que el Peridex® (clorhexidina al 0,12%) o que el hidróxido de calcio al 10% en Peridex® a las 24 horas, lo que difiere con los resultados encontrados en nuestro estudio. Este hecho puede ser explicado por la concentración de clorhexidina al 2%, a diferencia del Peridex®, usada por Lynne et al.

En relación al paramonoclorofenol alcanforado, en un estudio realizado en dentina, por Sukawat y Srisuwan (2002), demostraron que el hidróxido de calcio mezclado con paramonoclorofenol alcanforado, fue la medicación intracanal más efectiva al compararla con hidróxido de calcio mezclado con agua destilada e hidróxido de calcio mezclado con clorhexidina al 0,2%. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los reportados por estos autores en relación a la efectividad del hidróxido de calcio en vehículo de paramonoclorofenol alcanforado comparado al hidróxido de calcio en vehículo de suero, sin embargo, existe discrepancia en los resultados respecto a la comparación de hidróxido de calcio en vehículo de paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio en vehículo de clorhexidina. Esto puede explicarse por las distintas concentraciones de clorhexidina ocupadas en ambos estudios.

Siqueira et al. (1996) estudiaron la eficacia de la medicación de hidróxido de calcio asociado a suero fisiológico y a PMCFA, en dentina bovina infectada con *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*, en periodos de 1 hora, 1 día y 1 semana. Los resultados mostraron que la medicación de hidróxido de calcio con PMCFA fue efectiva eliminando bacterias en los túbulos después de 1 hora, excepto los *E. faecalis* que requieren 1 día de exposición. La medicación de hidróxido de calcio asociada al suero fisiológico fue inefectiva después de una semana de exposición al *Enterococcus faecalis* (Estrela, 1997). Aunque los resultados respecto a la eficacia de las medicaciones son similares a las obtenidas en nuestro estudio, ambos trabajos no son comparables ya que en nuestra investigación no se realizaron recuentos bacterianos en una sucesión de horas o días (Estrela, 1997).

Estrela et al (1997), en un estudio realizado en placas de agar acerca de la eficacia antimicrobiana de pastas de hidróxido de calcio, demostraron que el hidróxido de calcio en vehículo de PMCFA, fue tan efectivo a las 48 hrs, como hidróxido de calcio en vehículo de clorhexidina al 1% e hidróxido de calcio en vehículo de suero. Éste difiere de los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que no presenta diferencias en la efectividad de los diferentes vehículos. Sin embargo, la metodología empleada y el tiempo de acción de la medicación, son distintos a los nuestros y podrían, eventualmente ser la explicación a los resultados obtenidos.

De acuerdo a la literatura (Almyroudi et al, 2002; Basrani et al., 2003; Estrela, 1997; Gamonal, 2005; Lin et al, 2003; Savafi y Nakayama, 2000; Schaëfer y Bossmann, 2005; Sukawat y Srisuwan, 2002) la mayoría de los autores señalan que el hidróxido de calcio en vehículo de suero fisiológico o agua destilada, cuando se compara con hidróxido de calcio en vehículos con propiedades antimicrobianas, resulta ser menos efectivo contra *E.faecalis*. Sin embargo, cuando se compara con un grupo control (sin medicación), éste muestra efectividad antimicrobiana manifestada en una reducción en el número de colonias, lo que se explica debido a la acción bactericida del hidróxido de calcio proveniente de los iones hidroxilo (OH), que determinan un alza del pH.

Muchos estudios han sido dirigidos a encontrar la manera más efectiva de erradicar o prevenir el acceso de *E. faecalis* al canal radicular (Stuart et al, 2006). Algunos autores sugieren que el hidróxido de calcio es efectivo frente a *E.faecalis* (Allar et al; 1987; Ranta, 1988; Smith, 1984; Estrela, 1995,1997), en tanto otros demuestran la poca efectividad del hidróxido de calcio contra esta bacteria (Stevens & Grossman, 1985; Haapasalo &Orstavik, 1987; Savafi et al., 1990; Siqueira et al., 1996).

Existe controversia en relación al tiempo que necesita el hidróxido de calcio en diferentes vehículos para alcanzar el pH necesario para ejercer su acción antimicrobiana; Sjögren demostró que las bacterias no pueden sobrevivir después de 7 días a la medicación intracanal con hidróxido de calcio (Barbosa et al., 1997). Por el contrario, Estrela et al., (1997), estudiando el efecto antimicrobiano indirecto del hidróxido de calcio en los túbulos dentinarios infectados, demostraron que la cantidad de iones hidroxilo (OH⁻), liberados por hidróxido de calcio en 7 días, fue insuficiente para eliminar *E.faecalis*, induciendo solamente una inactivación enzimática reversible. Según este autor, una inactivación enzimática irreversible sobre este microorganismo, es alcanzada en un período de 12 a 72 hrs de contacto directo con la suspensión experimental. Los casos donde la inhibición del crecimiento bacteriano por el hidróxido de calcio en placas de agar es menor, podrían explicarse por una baja difusibilidad de éste en el agar o a la habilidad buffer del medio artificial para reducir su pH (Barbosa et al., 1997). Sin embargo, el tiempo requerido en clínica para este efecto es más largo.

Kwon et al., (1997) han mostrado que la hidroxiapatita de la dentina tiene una fuerte capacidad buffer que debe ser sobrepasada por la difusión de los iones hidroxilo a través de los túbulos dentinarios, por lo tanto, el valor del pH alcanzado, puede ser insuficiente para eliminar *E. faecalis* que pueden sobrevivir a pH 12,5 (Almyroudi et al, 2002).

Dentro de las limitaciones encontradas en nuestro estudio, el modelo usado in vitro, produce diferentes condiciones que las encontradas en forma clínica. Los conductos radiculares contienen tejidos necróticos y fluidos tisulares que reducen la actividad de las medicaciones. Además éstas fueron evaluadas solamente sobre una especie de microorganismo (*E. faecalis*), sin embargo, los conductos radiculares infectados contienen más de una especie de patógenos, lo cual favorece su persistencia dentro del conducto, debido a fenómenos de agregación y coagregación bacteriana. En las colonias bacterianas, las células ubicadas en el centro, podrían ser protegidas de los efectos letales del hidroxilo por las células que permanecen en la periferia. Asimismo, algunas especies bacterianas localizadas dentro de los túbulos dentinarios, pueden ser protegidas de los efectos del hidróxido de calcio por la capacidad buffer de la hidroxiapatita (Wang y Hume, 1988). Sin embargo, la permanencia del hidróxido de calcio por un período de tiempo extenso puede, eventualmente, permitir una continua difusión de los iones hidroxilo, suficientes para eliminar la mayoría de las bacterias remanentes (Barbosa et al, 1997).

Nuestra investigación se limitó a estudiar la eficacia de las medicaciones a los 10 días. Debido a razones de recursos y tiempo en un estudio de esta naturaleza, no se realizó recuento de CFU para cada grupo de medicación a las 24, 48 y 72 hrs, lo que hubiese resultado de gran utilidad para consignar el “peak” de eficacia de cada uno de los vehículos.

Por otra parte, los dientes utilizados fueron preparados de acuerdo a la Técnica para conductos aparentemente rectos de la Universidad de Valparaíso, siendo el diámetro final del conducto radicular distinto en cada diente y no estandarizados. Esta condición varía la cantidad de medicación recibida en cada diente, mientras que el volumen de *E. faecalis* inoculado fue el mismo para todas las muestras, lo que podría alterar el recuento final de CFU.

Creemos necesario considerar, que diferencias anatómicas entre los sistemas de conductos radiculares, inherente a cada unidad de estudio, podrían influir en la eficacia de los distintos grupos de medicaciones.

Por último, es importante enfatizar que una efectiva medicación no es suficiente para eliminar los microorganismos patógenos endodónticos del sistema de conductos radiculares. Una adecuada preparación biomecánica y apropiada irrigación en cuanto a volumen, frecuencia e intensidad, son indispensables en el éxito de la desinfección del conducto radicular.

VII. CONCLUSIONES

Basado en los resultados del presente estudio, sobre la eficacia antimicrobiana del hidróxido de Calcio en cuatro diferentes vehículos frente al *Enterococcus faecalis*, se puede concluir que:

- Existe diferencia en la eficacia antimicrobiana entre los distintos vehículos del hidróxido de calcio como medicación intraconducto frente al *Enterococcus faecalis*.
- Se demuestra que la Clorhexidina al 2 %, es el vehículo más eficaz del hidróxido de calcio frente al *Enterococcus faecalis*, sin embargo no presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo de PMCFA y al vehículo de suero fisiológico.
- El vehículo del hidróxido de calcio compuesto por Paramonoclorofenol alcaforado + Clorhexidina al 2 % es eficaz frente al *Enterococcus faecalis*, sin embargo resultó ser el vehículo menos eficaz comparado con los otros vehículos en estudio.

VIII. SUGERENCIAS

- Si bien esta investigación coincide con la mayoría de los estudios previos, aún existe controversia acerca de cuál es la medicación más eficaz para erradicar infecciones persistentes debidas a la presencia de *E. faecalis* en el sistema de conductos radiculares. Por lo tanto, sugerimos realizar nuevas investigaciones in vivo que nos permitan corroborar los resultados obtenidos en estudios in vitro realizados hasta el momento.
- Considerando la literatura disponible, nos dimos cuenta que la metodología usada en la mayoría de los estudios no considera recuentos cuantitativos o cualitativos de CFU en una sucesión de horas o días, el cual podría ser de gran utilidad, para evaluar la efectividad de las distintas medicaciones utilizadas contra *E. faecalis* en distintos periodos de tiempo.
- Debido a los resultados encontrados en este estudio respecto al vehículo de hidróxido de calcio compuesto por clorhexidina (Oralgene 2%) y PMCFA, creemos necesario realizar un estudio de tipo químico para determinar que fenómeno ocurre entre los componentes, que los hace menos efectivo en forma conjunta que por separado.

IX. RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar, in Vitro, la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio en cuatro diferentes vehículos frente al *Enterococcus faecalis*. Se realizó sobre una muestra de 60 dientes, previamente preparados en base a la técnica de la Universidad de Valparaíso, esterilizados e inoculados con 0,1 ml de *E. faecalis*. Posteriormente, fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos; Ca(OH)_2 en vehículo de suero fisiológico, Ca(OH)_2 en vehículo de Oralgene® 2 %, Ca(OH)_2 en vehículo de PMCFA, Ca(OH)_2 en un vehículo de PMCFA + Oralgene® 2%, con los cuales fueron medicados, sellados y llevados a cámara de cultivo por 10 días. Luego del retiro del sellado y medicación, se tomó una muestra de cada conducto que fue sometido a método de dilución, siembra por 24 hrs y recuento de colonias (CFU). El análisis de datos se realizó mediante el test de Anova. Al realizar el recuento de CFU, se obtuvo que Ca(OH)_2 en vehículo de Oralgene® 2% presenta en promedio el menor número de CFU (11,7), resultando similar a Ca(OH)_2 en vehículo de PMCFA (17,3), no existiendo una diferencia estadísticamente significativa para ambos grupos ($p > 0,05$). Ambas medicaciones resultaron ser más eficaces que Ca(OH)_2 en vehículo de suero fisiológico (25,7). La medicación en base a Ca(OH)_2 en vehículo de PMCFA+ Oralgene® 2%, presenta en promedio mayor número de CFU (54), existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), comparando ésta con Ca(OH)_2 en vehículo de Oralgene® 2% e Ca(OH)_2 en vehículo de PMCFA.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, Tatiana (2004) “Aspectos microbiológicos de la periodontitis apical crónica persistente” (en línea). Venezuela, disponible en:
<http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado 41.htm>

Almyroudi, A; Mackenzie, D; McHugh, S; (2002) “The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study” en *Journal of endodontics*. vol 28, No 3, pp.163-167.

Anthony,DR; Gordon, TM; Del Río, CE; (1982) “The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide” en *Oral Sugery Oral Med Oral Pathol*. 54, pp. 560-565.

Azuero.M.; Herrera;C; (2005) “Irrigantes de uso endodóntico”. Disponible en:
http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revision31.htm

Barbosa, CA; Goncalvez, RB; Siqueira, JF., De Uzeda, M; (1997) “Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorexidine, and camphorated paramonoclorophenol as intracanal medicament: A clinical and laboratory study en *Journal of Endodontics*. vol 23, No 5, pp. 297-300.

Bascones, A; Manso, F. J; (1994) “Clorhexidina en odontoestomatología”: Conceptos actuales y revisión de la literatura” en *Avances en odontoestomatología*. 10, pp. 685-708.

Basrani, B; Tjäderhane, L; Santos, JM; Pascon, E; Grad, H; Lawrence H; Friedman, Sh. (2003) “Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro” en *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol*. vol 96, pp. 618-624.

Basrani, B; Ghanem, A, Tjaderhane; (2004) “Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications” en *LJ Endod*. Jun; 30(6):413-7

Baumgartner, JC; (1987) “A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens” en *Journal of Endodontics*. vol 13, No 4, pp.147-157.

Baumgartner, JC; Cuenin, PR; (1992) “Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation” en *J endod*. vol 18, No 12, pp.605-612.

Bergenholtz, G; Crawford, J; (1991) “Microbiología endodóntica.” en: Walton, R; Torabinejad, M. *Endodoncia, principios y práctica clínica*. pp. 287-302. México. Editorial Interamericana McGraw-Hill.

Bóveda, C; (2004) “Medicación intradentaria intermedia en tratamientos de conductos”.
Venezuela, disponible en:
http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_38.htm

Bystrom, A; Claesson, R; Sundqvist, G; (1985) “The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals” en *Endod Dent Traumatology* 1 (5), pp.170-5.

Canalda, C; (2001) *Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas*. pp. 29-41. España, Masson.

Caviedes, J., Meneses, J; (2005) “Problemática del conducto abierto a la cavidad oral” (en línea). Colombia. Disponible en:
http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revisio22.html.

Cohen, B; (1999). *Vías de la pulpa*. Pp. 206-207. Madrid, España. Ed. Harcourt

Drake, DR; Wiemman, AH; (1994) “Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer” en *Journal of Endodontics*. vol 20, No 2, pp. 78-82.

Estrela, C; Sydney, GB;Bammann, LL; Felipe, Jr O; (1995) “Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria” en *Brazilian Dental Journal*. vol 6, No 2, pp.85-90.

Estrela ,C; Pesce H; (1996) “Chemical Analysis of the Liberation of Calcium and Hidroxil Ions of Calcium Hydroxide pastas in the Presence of Connective Tissue of the Dog.” Part I. En *Brazilian Dental Journal*. vol 7, No 1, pp.41-46.

Estrela, Carlos; (1997) “Efecto antimicrobiano de las pastas de hidróxido de calcio” Brasil, disponible en: http://www.forp.usp.br/restauradora/Teses/estrela/estrela_id/estrela_id.pdf.

Estrela, C; Pécora, JD; Silva, RS; (1998) “pH analyse of vehicles and calcium hydroxide pastes” en *Brazilian Endodontic Journal*. vol 3, pp.41-7.

Estrela, C; Pécora, JD; Souza-Neto, MD; Estrela, CRA; Bammann, LL; (1999) “Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide paste” en *Brazilian Dental Journal* vol10, pp.63-72.

Estrela, C., Rodriguez, C; Guimaraes, L; Santana, R; Djalma,J;(2005) “Surface tension of calcium hydroxide associated with different sustancias” en *Journal of Applied Oral Science*. vol 13. No2. Apr/June.

Evans, M; Davies, JK; Sundqvist, G; Figdor, D; (2002) “Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide” en *International Endodontic Journal* .vol 35, pp. 221-228.

Fava, LRG; Saunders, WP; (1999), "Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications" en *International Endodontic Journal*. vol 32, pp. 257-82.

Ferrari, P; Cai, S; Bombana, A.C; (2005) "Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeast in primary endodontic infections" en *International Endodontic Journal*. vol 38, pp.372- 380.

Foreman, P.C; Barnes, I.E; (1990) "A review of calcium hydroxide" en *International Endodontic Journal*. vol 23, pp. 283-297.

Gamonal, J; Gajardo, M; Silva; Gómez, L ;(2005) "Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population." en *Journal of Periodontology*. vol 76 No 2, pp 289-294.

Genco, RJ; Hammond,BF; (1993) "Sensibilidad de los microorganismos periodontales a los antibioticos y otros agentes antimicrobianos". *Periodoncia*, Genco RJ., Goldman HM., Cohen DW. Eds. Mexico D.F., Interamericana McGraw Hill, pp. 176-178.

Glossary: American Association of Endodontics (1998) Contemporary terminology for endodontics.6^a Ed. Chicago.

Gomez, B; Souza, S; Ferraz, C; et al (2003) " Effectiveness of 2% clorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro." en *International Endodontic Journal* 36, pp. 267-75.

Heling, I; Chander, NP; (1998) "Antimicrobial effect of Irrigant Combinations Whiting dentinal tubules" en *International Endodontic Journal*. vol 31,pp.8-14.

Ingle, J; Bakland, L; (1996) *Endodoncia*. Cuarta edición, Mexico, editorial Mc Graw- Hill interamericana.

Jiménez, A; Pulido, E; Herrera, C. (2002) "Bases biológicas del hidróxido de calcio con respecto a su acción antimicrobiana y neoformación de tejido" en *Revista de la Federación Odontológica Colombiana*, No 204, Oct –Dic, Colombia. Disponible en: <http://www.encolombia.com/odontología/foc/foc64dic-basesbiologicas.htm> (2002).

Johnson, B; Remeikis, N; (1993) "Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution" en *Journal of Endodontics*. vol 19, No , pp. 40-43.

Kabayashi, H; Suzuki, T; Kiroshita, N; Unemoto; (1984) "T Amplification of the *Streptococcus faecalis* Proton-Translocating ATPase by Decrease in Cytoplasmic pH" en *Journal of Bacteriology*. vol 58, No 3, pp. 1157-1160.

Kayaoglu, G; Erten, H; Orstavik, D; (2005) "Growth at high ph increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen" en *International Endodontic Journal* vol 38, pp. 389-396.

Lasala, A; (1992) *Endodoncia*. Cuarta edición. Barcelona, Ediciones científicas y técnicas.

Llamas, R; Segura, J; Jiménez-Rubio, A; Jiménez-Planas, A; (1997) "In Vitro Effect of Parachlorophenol and Camphorated Parachlorophenol on Macrophages" en *Journal of endodontics*. vol.23, No 12, pp.728-730.

Leonardo, MR; Tanomeru, M; Silva, LA, Nelson, P; Bonifacio, KC; (1999) "In vivo antimicrobial activity of 2% clorhexidine used as root canal irrigating solution" en *Journal of Endodontics*. vol. 25, No 3, pp. 167-171.

Liébana Ureña; (2002) *Microbiología Oral J*. Segunda edición Cáp 56; 32, pp. 42. México, Ed McGraw-Hill Interamericana.

Lin, YH; Mickel, AK; Chogle, S; (2003) "Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*" en *Journal of endodontics*. vol. 29, No 9, pp. 565-566.

Lopes, HP; Estrela, Elías; (1996) "Comparative Study of calcified bridge after pulpotomy and the Use of Calcium Hydroxide Associated with different Vehicles" en *Brazilian Endodontic Journal*. vol 1, No 1, pp.39-43.

Lynne, R; Liewehr, F; West, L; Patton, W; Buxton, Th; McPherson, J; (2003) "In vitro Antimicrobial Activity of Various Medication Preparations on *E.faecalis* in Root Canal Dentin" en *Journal of Endodontics*. vol.29, No 3, pp.187-189.

Mateos, P; (2006) "Relación huésped- parásito: factores de patogenicidad microbiana". Universidad de Salamanca, España.
<http://edicionmicro.usal.es/web/educativo/micro2/tema17.html>

McHugh, Ch; Ping Zhang; Michalek; Eleazar, P; (2004) "pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro" en *Journal of Endodontics*. vol 30, No 4.

Murray, P; (2002) *Microbiología Médica*. Cuarta edición. Madrid, Ed Elsevier.

Nageshwar, R; Kidiyoor, HK; Hegde, C (2004) "Efficacy of calcium hydroxide - chlorhexidine paste against *Enterococcus faecalis*- An in vitro study". *Endontology* Vol 16, pp 61- 64. Disponible en: <http://medind.nic.in/ea/t04/i2/eaat04i2p61.pdf>

Pinheiro, E; Gomes; Drucker, D; Zaia; Ferraz, C ; Souza-Filho, F; (2004) “Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions” en *International Endodontic Journal*. vol 37, pp. 756-763.

Piskin, B; Türkün, M; (1995) “Stability of various sodium hypochlorite solutions” en *Journal of Endodontics*. vol 21, No 5, pp. 253-255.

Portenier, I; Waltimo, T; Orstavik, D, Haapasalo, M; (2005) “ The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of enterococcus faecalis to endodontic medicaments” en *Journal of Endodontics*. vol 31, No 5, pp. 380-386.

Ribeiro, C (2002) “Avaliação do Ph e liberação de calcio, na utilização intracanal de pastas à base de hidróxido de calcio, em função do tempo e de diferentes veículos”.

Ribeiro, D; Alencar, M,; Fávero, D; (2004) “Lack of Genotoxicity of formocresol, Paramonochlorophenol, and Calcium Hydroxide on Mammalian Cells by Comet Assay” en *Journal of Endodontics* . vol 30, No 8, pp. 593-596.

Rocas, I; Siqueira, J; Santos, K, (2004) “Association of *Enterococcus faecalis* with Different Forms of Periradicular Diseases” en *Journal of Endodontics*. vol 30, No 5, pp. 315-320.

Rodríguez, G; (2002) “Géneros Streptococcus y enterococcus”. Disponible en:
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/libro2002/cap%2018.pdf#search%22www.higiene.edu.uy%2Fcefa%2Flibro2002%2Fcap%2018.pdf%22> (2002).

Saars: *Enterococcus* spp (microbiology)

http://members.tripod.com/piece_de_resistance/SAARS/bugs/menteroc.htm

Savafi, KE, Nicols, FC; (1994) “Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccaride by calcium hydroxide treatment” en *Journal of Endodontics*. vol 20, pp. 127-129.

Savafi, K, Nakayama, T; (2000) “Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution” en *Journal of Endodontics*. vol 26, No11, pp. 640-651.

Schaëfer, E, Bossmann, K; (2005) “Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis*” en *Journal of Endodontics*. vol 31, No1, pp. 53-55.

Sedgley, C, Lennan, L; Appelbe, OK; (2005) “Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo” en *International Endodontic Journal*. vol 38, pp. 735-742.

Siqueira, JF; Lima, KC; Magalhaes, FAC; Lopes, HP, Uzeda, M; (1997) "Mechanical reduction of the bacterial cell number inside the root canal by three instrumentation techniques" en *Journal of endodontics*. vol 25, pp. 332-335.

Siqueira ,JF; Machado, AG, Siveira, Rm; Lopez, Hp, Uzeda, M; (1997) "Evaluation of the effectiveness of sodium Hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canals" en *International Endodontic Journal*. vol 30, pp. 279-282.

Siqueira, J; Rocas, I; Souto, R, Uzeda, M, Colombo, A; (2001) "Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization" en *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. vol 92, No 4, pp. 451-457.

Siqueira, JF Jr; (2001) "Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail" en *International Endodontic Journal*. vol 34, 1-10.

Siqueira, JF; Rocas, I, Souto, R, de Uzeda, M; Colombo, A; (2002)"*Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections" en *Journal of Endodontics*. vol 28, No 3, pp.168-172.

Siqueira, JF; Rocas, I; (2005) "Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2: Redefining the Endodontic Microbiota" en *Journal of Endodontics*. vol 31, No 7, pp. 488-498.

Southard, SR, Drisko, CL; Killoy, WJ; Coob, CM; Tira, DE; (1989) "The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of bacteroides gingivalis in periodontal pockets" en *Journal of periodontology*. vol 60, No 6, pp. 302-309.

Spangberg, L; (1994)"Medicación intracanalicular" en Ingle, J. Bakland L., editores. *Endodoncia*. Cuarta Edición. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Stamos, DG; Haash, GC; Gerstein, H; (1985) "The pH of local anesthetic/ calcium hydroxide solutions" en *Journal of Endodontics*. Vol 11, pp. 264-5.

Stuart, Ch; Schwartz, S; Beeson, T; Owatz, C; (2006) "*Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment" en *Journal of endodontics*. vol 32, No2, pp. 93-98.

Sukawat, C; Srisuwan, T; (2002) "A comparison of the antimicrobial efficacy of the calcium hydroxide formulations o human dentin infected with *enterococcus faecalis*" en *Journal of endodontics*. vol28, No 21, pp. 102-104.

Sundqvist, G; (1976) "Bacteriological studies of necrotic dental pulps" Umea University Odontological Dissertation, Umea, Suecia.

Tasman, F; Cehreli, Zc; Ogan, C; Etikan, I; (2000) "Surface tension of root canal irrigants" en *Journal of Endodontics*. vol 26, No10, pp.586-587.

Ten Cate, AR; (1998) "Oral histology development, structure and function". 5ta Edición. pp. 150-196 San Luis, Mosby.

Teixeira, K; Cortés, M; (2005) "Estado actual de la indicación de antimicrobianos para la medicación intracanal" Venezuela, disponible en:

http://www.actaodontologica.com/43_2_2005/indicacion_antimicrobianos_medicacion_intracanal.asp

University of Maryland (2000) "Pathogenic Microbiology- Enterococcus Summary". USA, disponible en: http://biology.rennon.edu/microbial_biorealum/bacteria/gram-positive/enterococcus/enterococcus.htm

Vadhay, T; Pitt, R; (1993) "Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro" en *Endodontic Dental Traumatology*. vol 9, pp.243-248.

Vivacqua-Gomes, N; Gurgel-Filho, E .D;Gomes, B; Ferraz, C; Zaia,A; Souza-Filho,F; (2005) "Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple- visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo" en *International Endodontic Journal* vol 38, pp. 697-704.

Walton, RE; Torabinejad, M (1997) "Endodoncia Principios y práctica". 2da Edición.México, Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Wakabayashi, H; Morita, S; Kova K, Tachibana, H; Matsumoto, K; (1995) "Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall" en *Journal of endodontics*. vol 21, pp. 543-545.

Wang, JD; Hume, WR; (1988) "Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion various sources though dentine" en *International Endodontic Journal*, vol 21, pp.17-26.

Weine, FS; Pisano, JV; (1997) Microbiología endodóntica en: "Tratamiento endodóntico", *Weine FS*. pp. 694- 705. Madrid, España. Editorial Harcourt-Brace.

White, R; Hays, G; (1997) "Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine" en *Journal of Endodontics*. vol 23, No 4, pp. 229-231.

Yang, S; Rivera, E; (1996) "Canal debridemennt: effectiveness of sodium hypochlorite and calcium hydroxide as medicaments" en *Journal of Endodontics*. vol 22 ,No10, pp. 521-524.

Yawetz, E; Melnick, J; Alderberg; (1992) *Microbiología Médica*. pág 15-30 México, Ed El manual Moderno.

XI. ANEXOS

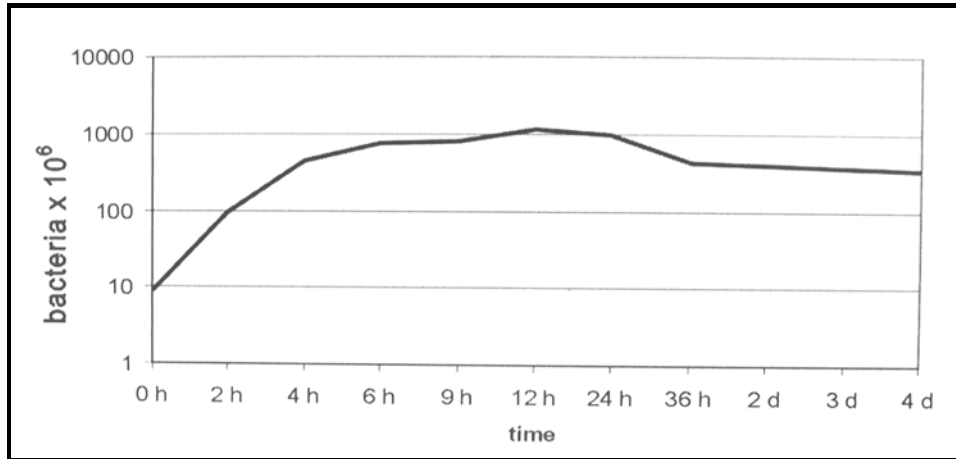


Imagen n° 45: Curva de crecimiento de *E. faecalis* (Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M 2005).



Imagen n° 46 y 47: Túbulos dentinarios infectados por *E. faecalis* después de 24 hrs y 60 días respectivamente (Vivacqua-Gomes et al., 2005) (Almyroudi et al., 2002).