



**EVALUACION DE EFICACIA ANTIMICROBIANA DEL
PROPÓLEO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*
COMPARADO CON HIDROXIDO DE CALCIO Y CLORHEXIDINA:
ESTUDIO IN VITRO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Felipe Pereira Figueroa
Rodrigo Pérez Goldberg
Oskar Pieringer Baeza

Docente Guía: Prof. Dra. Emma Fuenzalida Novajas
Cátedra de Endodoncia
Docente Informante: Prof. Dr. Jorge Torres Maldonado
Cátedra de Microbiología

Valparaíso – Chile
2012

Doy gracias a Dios en primer lugar porque nada de lo que ha sucedido en mi vida escapa de su control, ésta etapa que se cierra no fue la excepción en ningún momento; ni en los que se aprendió de la angustia y adversidad, ni en los que se sonrió en el difícil camino.

A mi familia, Orlando Pereira, Ivette Figueroa, Javiera Pereira; mi espacio, mi pilar, mi instrucción, mi empuje y coraje durante mis etapas de formación como persona. Mi corazón, pensamientos, alegrías, y recuerdos estarán siempre a su lado.

Y a Carla Cambiaso, mi tasita, en una carta me escribiste que querías llegar a ser el apoyo necesario para mí, me querías hacer feliz, me regalarías mil goles y me traerías el sur a mi puerta con sus estrellas; has cumplido cada una de tus promesas Carla, envolviste todo en tu persona para mí.

Gracias a todos.

A mi familia y polola quienes siempre estuvieron apoyándome en cada momento, dándome palabras de afecto, demostraciones de cariño y compañía. Y todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron a que el sueño se cumpliera.

Esta tesis esta dedicada a la persona más importante, esforzada y cariñosa...

Mi Madre

Primero que todo, doy gracias Dios que se hizo presente en los momentos más difíciles de esta carrera, dándome tranquilidad y esperanza de que todo terminaría para bien.

Dar las gracias a mi madre, María Angélica Baeza que siempre se hizo presente en las noches frías de estudio, con una palabra de aliento y cariño; en los momentos complicados, con un abrazo lleno de amor y comprensión.

Un agradecimiento especial, a mis hermanos Johnny y Christian, que siempre han sido parte de mi modelo a seguir, que me motivó desde pequeño a alcanzar el sueño de ser profesional. Gracias por su cariño y apoyo.

A mis sobrinos, que de alguna manera juegan parte fundamental en el deseo de ser alguien a quién puedan seguir de ejemplo, haciendo que en los momentos difíciles sacara fuerza, templanza y sabiduría.

Gracias amigos, Rodrigo, Felipe y Luis, por el apoyo y los buenos momentos. Siempre fueron los más ciertos en las horas más inciertas.

Por último, este trabajo final está dedicado a Jonny Pieringer Yañez, mi padre...Que estás en los cielos viendo el fin de este capítulo en asiento preferencial y ojalá, aplaudiendo.

Las palabras de agradecimiento faltan, para demostrarte todo lo que hiciste por mí y cómo influiste en mí como persona, para que llegara al fin a esta instancia. Gracias por tus sabios consejos, tu amor incondicional, tu apoyo, tus abrazos y tus risas... Te quiero, viejo.

Nuestros sinceros y humildes Agradecimientos a:

Cada uno de los miembros de nuestras familias por su apoyo, confianza y entrega por nosotros y nuestro trabajo.

Al Dr. Jorge Torres cuya disposición, tiempo e instrucción fue de fundamental importancia en el desarrollo y ejecución del trabajo de tesis de este grupo.

A Dra. Emma Fuenzalida por su incondicional apoyo y guía en la formulación, proyección y desarrollo del presente proyecto de tesis.

A Camila Aros Ochoa, jefa de Laboratorio de Bioprocesos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por su tiempo y dedicación en la instrucción de manejo de técnicas de cultivo microbiológico en laboratorio.

A todo el personal administrativo y auxiliar de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso por su disposición y amabilidad no solo durante todo el transcurso y desarrollo del proyecto de tesis, sino que también durante toda la Carrera.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	MARCO TEORICO	2
II.1	Estructura y funciones del complejo dentinopulpar	2
II.1.1	Pulpa Dental	2
II.1.2	Dentina	3
II.2	Anatomía de los conductos radiculares.....	3
II.3	Microbiología En Endodoncia	4
II.4	Microbiología De Los Conductos Radiculares	4
II.4.1	Tipos de Infección Endodóntica.....	5
II.4.2	Vías de infección del conducto radicular	6
II.4.3	Condiciones ambientales necesarias para el desarrollo microbiano ...	7
II.5	Medios de Cultivos	9
II.5.1	Composición de un Medio de Cultivo	9
II.5.2	Condiciones de Incubación de un Cultivo.....	10
II.5.3	Clasificación de los Medios de Cultivo.....	10
II.6	Enterococcus faecalis.....	11
II.6.1	Generalidades	11
II.6.2	Estructura celular.....	11
II.6.3	Identificación de Laboratorio.....	12
II.6.4	Patogenia de Enterococcus faecalis.....	12
II.7	Preparación Biomecánica (PBM)	13
II.8	Irrigación.....	13
II.8.1	Soluciones de Irrigación	15
II.8.2	Momento de la irrigación	15
II.9	Medicación Endodóntica Intraconducto.....	16
II.10	Hidróxido de Calcio (Ca (OH) ₂)	17
II.11	Clorhexidina (CHX)	19
II.12	Propóleo.....	22
II.12.1	Actividad antibacteriana.....	25
II.12.2	Actividad antiviral.....	26

II.12.3 Actividad antifúngica:.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODO	27
III.1 Hipótesis.....	27
III.2 Objetivos	27
III.2.1 General.....	27
III.2.2 Específicos.	27
III.3 Variables	28
III.3.1 Definiciones Conceptuales/ Operacionales.	28
III.4 Diseño	28
III.5 Universo	28
III.6 Muestra	29
Selección de la muestra.....	29
III.6.1 Asignación de sujetos a tratamientos	29
III.6.2 Criterios de Inclusión	30
III.6.3 Criterios de Exclusión:.....	30
III.6.4 Unidad de Estudio	30
III.7 Calibración	30
III.8 Procedimiento	31
III.8.1 Preparación de la Muestra.....	31
III.8.2 Laboratorio.	32
III.8.3 Etapa de preparación del experimento.	32
Inoculación dentaria.....	33
Cultivo bacteriológico pretratamiento.....	33
Cultivo Bacteriológico postratamiento.....	34
IV. ANALISIS ESTADISTICO.....	36
V. RESULTADOS	37
V.1 Estadística Descriptiva	37
V.2 Análisis Estadístico	42
VI. DISCUSION.....	44
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. SUGERENCIAS	49

IX. RESUMEN..... 50

X. BIBLIOGRAFÍA..... 51

I. INTRODUCCION

En nuestro planeta existe una gran diversidad de fauna y flora, esta última se ha visto que es capaz de determinar diferentes composiciones de un mismo producto. Así, el Propóleo, que podrá tener diferente capacidad bactericida, dependiendo si en su elaboración realizada por la abeja melífera, está presente el ácido caféico fenilester y/o flavonoides, compuestos usualmente encontrados en propóleos que distan del trópico.

En la terapia endodóntica esta ampliamente comprobado que la presencia del *Enterococcus faecalis* esta asociado a fracasos endodónticos. Son muchas las investigaciones que buscan el agente antimicrobiano indicado para combatir esta bacteria. Si bien el hidróxido de calcio es considerado como gold standard por su amplio rango de acción antimicrobiano, se ha visto que el *E. faecalis* es capaz de sobrevivir al medio generado por el hidróxido de calcio que logra llegar a un pH 12 y que este agente infeccioso se ha visto que es capaz de soportar medios con pH de hasta 12.5, generándose controversia en la eficacia de este fármaco frente a esta bacteria. Otros fármacos como la clorhexidina han mostrado un mejor resultado contra este patógeno, cuando es utilizado en forma individual o asociado a otros agentes.

El objetivo de este estudio es evaluar la acción antibacteriana del Propóleo 10mg/ml, contra la bacteria *E. faecalis*, comparando su acción con el hidróxido de calcio y la clorhexidina. El Propóleo es un agente que en las últimas décadas esta siendo probado en diferentes disciplinas de odontología como Endodoncia y Periodoncia con buenos resultados, entre sus propiedades destacan efectos antivirales, antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios, anticancerígenos e inmunomoduladores. Además presenta buena aceptación, por ser un agente de origen natural con muy pocas contraindicaciones.

Se evaluarán 45 dientes preparados e inoculados con la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, los cuales fueron solicitados mediante formulario al Instituto de Salud Pública (ISP). Se ocupó dicha cepa, ya que es esta bacteria la que se ha comprobado científicamente la que está presente en los fracasos endodónticos (De la Maza & Torres, 2006). Luego, los objetos de estudio fueron divididos en tres grupos aleatorizados, cada uno sometido a la acción de un antimicrobiano: Grupo 1 (Hidróxido de calcio), Grupo 2 (CHX al 2%) y Grupo 3 (Propóleo al 10%). Y se determinará cual presenta mejores resultados en cuanto a inhibición de UFC.

II. MARCO TEORICO

El proceso de desinfección de los conductos radiculares ha sido investigado y evaluado con diversos enfoques. Se acepta que uno de los factores determinantes, considerado como prerrequisito para la instalación de la patología pulpar y periapical es la presencia de microorganismos.

La eliminación de los microorganismos de los conductos radiculares infectados con periodontitis apicales ha sido una constante preocupación, demostrada por investigaciones que estudiaron la microbiota endodóntica, la eficacia de la instrumentación mecánica; la influencia de la irrigación y medicación intraconducto y sistémica en la búsqueda de alternativas de tratamiento antimicrobiano para esta patología.

II.1 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL COMPLEJO DENTINOPULPAR

II.1.1 PULPA DENTAL

Corresponde a un tejido conectivo laxo de origen mesenquimatoso, con células especializadas denominadas odontoblastos, dispuestos periféricamente en contacto directo con la matriz de dentina. Este tejido se *denomina complejo dentino pulpar*, siendo por esto que la pulpa y dentina se deben considerar una unidad morfofuncional.

La pulpa dental se encuentra situada en el interior de un medio poco distensible, que limita su capacidad para aumentar de volumen durante los episodios de vasodilatación y presión tisular aumentada; por lo cual cobra gran importancia que se produzca una regulación cuidadosa del flujo sanguíneo.

La pulpa alberga elementos tisulares, entre los que se incluyen nervios, tejido vascular, fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos, células inmunocompetentes y otros elementos celulares. (Cohen & Burns, 2004)

Los nervios sensitivos presentes en la pulpa y de forma más restringida en la dentina, permiten la percepción de estímulos externos o internos, o de ambos tipos. Se localizan en toda la pulpa, pero abundan en el plexo de Raschkow, en la zona subodontoblástica, desde donde las fibras se insinúan en la capa de odontoblastos y eventualmente penetran en los túbulos dentinarios. (Soares & Goldberg, 2003)

Después del desarrollo dental, la pulpa conserva su capacidad para formar dentina a lo largo de toda la vida. Esto permite que la pulpa vital compense parcialmente la pérdida de esmalte o dentina causada por un traumatismo mecánico o una enfermedad. (Cohen & Burns, 2004)

A medida que avanza la edad, el volumen pulpar se reduce a causa de la producción de dentina secundaria y de la generación eventual de dentina terciaria. A su vez el contenido celular disminuye, mientras aumenta de manera proporcional el contenido de colágeno. La circulación se reduce debido al estrechamiento de los accesos a través de los forámenes y por procesos degenerativos vasculares. (Soares & Goldberg, 2003)

II.1.2 DENTINA

La dentina madura se compone de aproximadamente un 70% de material inorgánico y un 10 % de agua. Su principal componente inorgánico es la Hidroxiapatita. La matriz orgánica representa el 20 % de la dentina, siendo el 91 % colágeno. La mayor parte del colágeno es tipo I, y un componente menor de colágeno tipo V. Además dentro de los componentes orgánicos se encuentran fosfoproteínas, proteoglicanos, proteínas que contienen g-carboxiglutamato-n, glucoproteínas ácidas, factores de crecimiento y lípidos. (Cohen & Burns, 2004)

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 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)

II.2 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 & 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 en su anatomía.

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

II.3 MICROBIOLOGIA EN ENDODONCIA

La Microbiología es el estudio de microorganismos como bacterias, hongos, protozoarios y virus, dentro de un concepto más amplio que es el estudio de los agentes infecciosos que afectan al hombre.

El origen de estos agentes infecciosos radica hace más de 4 billones de años, por lo que son los entes más antiguos de la faz de la tierra. Pero, a pesar de tal longevidad no fue hasta el año 1674 donde fueron estudiados por el holandés Anton van Leeuwenhoek.

El estudio de los microorganismos ha servido para determinar su papel en la patogénesis de muchas enfermedades que sufren los humanos incluyendo, la infección de los conductos radiculares.

II.4 MICROBIOLOGIA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

Entendiendo lo anterior es como se pudo definir que la periodontitis apical corresponde a un proceso inflamatorio que puede ser de etiología bacteriana producto de la infección de los conductos radiculares.

Todo esto fue comprobado en 1894 por Miller, donde se demostró la invasión bacteriana de los túbulos dentinarios consiguiéndose datos acerca de la microbiota tubular que consistía principalmente en cocos y bacilos. Pero solo hasta 1965 con el trabajo de Kakeshi et al., que aportó gran evidencia experimental se logró corroborar el papel fundamental de las bacterias en la enfermedad pulpar y periapical (Aguilar, 2004).

De esta manera se entiende que la periodontitis apical suele desarrollarse luego de una necrosis pulpar que es producida principalmente por bacterias, aunque se han encontrado virus y hongos. Estos microorganismos acceden a la zona de los tejidos perirradiculares a través del foramen apical y los conductos laterales. El desequilibrio que se produce entre bacterias y defensas del hospedero producen una inflamación generándose la periodontitis apical.

De acuerdo al trabajo de Korzen et al., el grado de inflamación pulpar y periapical se relaciona directamente con la cantidad de microorganismos existentes en el sistema de conductos radiculares, además del tiempo en que permanecen sin ningún tratamiento. También se encontraron datos concluyentes en que la severidad es mayor en infecciones mixtas que en infecciones producidas por una sola especie de microorganismo (Aguilar, 2004).

Con estos antecedentes se puede comprender que el objetivo principal del tratamiento endodóntico es evitar el desarrollo de la infección periapical o crear las condiciones para que ocurra la curación o reparación de los tejidos perirradiculares.

II.4.1 TIPOS DE INFECCIÓN ENDODÓNTICA

Según Torabinejad es posible clasificar los tipos de infecciones de acuerdo a su posición anatómica. De esta manera se puede determinar que existen distintos tipos de microbiota para los distintos tipos de infección y forma de periodontitis apical. Es por esto que las infecciones se clasifican de la siguiente manera (Torabinejad & Walton, 2002).

Infecciones Intraradiculares

Los microorganismos que colonizan los conductos radiculares pueden generar infecciones primarias, secundarias o persistentes.

Infecciones Intraradiculares Primarias

Corresponde a la invasión de los microorganismos del tejido pulpar necrosado, también conocida como infección "inicial". Este tipo de infección corresponde cuando los microorganismos involucrados llevan a la pulpa a un estado de necrosis, así como también cuando las bacterias aprovechan las condiciones de los conductos radiculares posterior a la necrosis pulpar. La microbiota por lo general en este tipo de infecciones es mixta, predominando las bacterias anaerobias estrictas, pudiendo encontrar algunas especies facultativas. Además, las bacterias de tipo gram negativas son las más predominantes en este tipo de infecciones (Torabinejad & Walton, 2002).

Infecciones Intrarradiculares Secundarias

Corresponde a la invasión de los conductos radiculares por microorganismos que no estuvieron presentes en la infección primaria, accediendo a ellos en algún momento de la intervención profesional. Los principales momentos en los que puede ocurrir este tipo de invasión es durante el tratamiento, entre sesiones y al momento de la obturación (Torabinejad & Walton, 2002).

Infecciones Intrarradiculares Persistentes

Corresponde a aquella infección que es producida por bacterias que lograron resistir el tratamiento antimicrobiano de los conductos y que pudieron adaptarse a períodos de ausencia de nutrientes.

Por lo general la microbiota de las infecciones intrarradiculares secundarias y persistentes son semejantes. Se debe tener en cuenta que estas especies pueden haber estado antes de que el conducto haya sido obturado, y si este fuese el caso, dicha especie resistió el tratamiento antimicrobiano y los períodos de ausencia de nutrientes (Torabinejad & Walton, 2002).

Se ha comprobado que la microbiota es predominantemente gram positiva con especies como: *estreptococos*, *lactobacilos*, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium*, etc. De esta manera se puede sustentar la hipótesis acerca de que las bacterias grampositivas pueden ser más resistentes a los tratamientos antimicrobianos y tienen la capacidad de adaptarse a las rigurosidades ambientales (Torabinejad & Walton, 2002).

Infecciones Extrarradiculares

Corresponde a la invasión y proliferación de microorganismos en los tejidos periapicales, que por lo general derivan de infecciones intrarradiculares. La forma más común de infección extrarradicular es el absceso apical agudo.

II.4.2 VÍAS DE INFECCION DEL CONDUCTO RADICULAR

Normalmente la pulpa y la dentina están estériles, encontrándose aisladas del medio externo por el cemento y el esmalte. Existen ocasiones donde la integridad de estas estructuras es mermada por procesos externos de tipo biológico, químico o físico como: la caries dental, restauraciones, trauma, etc., dejando expuesta la pulpa al medio bucal generando la colonización por parte de microorganismos, con la consiguiente infección. Esta migración de bacterias también es posible a través de otras vías. Dentro de esta sección se relatará las principales formas de vías de invasión microbiana.

Comunicación directa de la cavidad oral con la pulpa

Siempre que la dentina queda expuesta es probable que haya contaminación de la pulpa debido a la permeabilidad de la misma, la que se debe a la presencia de los túbulos dentinarios. Es por esta razón que la causa más común de infección de la pulpa dental es a través de la dentina cariada mediante los túbulos dentinarios (Liébana, 2002). Esta infección puede deberse a una causa netamente mecánica como puede ser a través de un trauma, donde la pulpa queda en contacto directo con

la cavidad bucal; también a través de procesos más crónicos como lo son abrasiones, atriciones y erosiones; y también realizando maniobras operatorias que dejan al descubierto los túbulos dentinarios permitiendo su colonización.

Vía Periodontal

Corresponde a aquella infección derivada de una enfermedad periodontal, donde la bolsa periodontal alcanza el foramen apical o un conducto lateral, por el cual la infección se propaga hacia la pulpa dental y sus ramificaciones. (Liébana, 2002)

Contigüidad

Es el caso cuando la infección de la pulpa dental se extiende de tal manera que afecta un diente sano adyacente. Por lo general, la osteítis, osteomielitis y quistes en las zonas apicales conducen a necrosis pulpar. (Aguilar, 2004)

Anacoresis o Hematógena

Corresponde al mecanismo mediante el cual las bacterias pueden infectar la pulpa de un diente a través del torrente sanguíneo, pero para que ello ocurra debe haber un proceso inflamatorio que inhabilite los mecanismos de defensa y facilite las condiciones para la colonización bacteriana, siendo esta vía la menos probable. (Liébana, 2002)

II.4.3 CONDICIONES AMBIENTALES NECESARIAS PARA EL DESARROLLO MICROBIANO

Para que los microorganismos puedan conformar una microbiota estable, es necesario que existan condiciones y mecanismos que permitan su supervivencia y de esta manera poder multiplicarse. Dentro de estos determinantes ecológicos se encuentran (Liébana, 2002):

Fisicoquímicos

- **Humedad:** Es requerida por las bacterias para el intercambio de nutrientes, reacciones metabólicas y eliminación de productos inhibidores de desecho.
- **pH:** El oscilante ph de la cavidad oral (6.5 – 7.5), denota una importancia a nivel de metabolismo bacteriano.
- **Temperatura:** Constituye el factor principal, que debe ser de ± 37 °C. Al igual que el pH, hay variaciones a nivel intraoral, cuando se consumen alimentos fríos o calientes lo que determina que algunos microorganismos mueran al no poder adaptarse a las condiciones.
- **Potencial de Oxido-Reducción:** Corresponde al intercambio de electrones que oxigenan o reducen un medio, permitiendo el desarrollo determinadas cepas bacterianas. Los microorganismos anaerobios sobreviven en un hábitat con un bajo potencial de oxido reducción, que se encuentra en estas condiciones por la actividad metabólica de los microorganismos que consumen el oxígeno mediante la respiración. Por

otro lado, un hábitat con un alto potencial redox, permitirá el desarrollo y crecimiento de bacterias aerobias.

Factores de adhesión, agregación y coagregación:

- **Adhesión:** Corresponde a la interrelación que se da entre los microorganismos y el hospedero, que permite la colonización de los tejidos.
- **Agregación y Coagregación:** Capacidad que poseen las bacterias de una misma especie o una diferente para unirse, acumularse y formar colonias (Aguilar, 2004).
- **Factores nutricionales:** El crecimiento bacteriano a nivel de los conductos radiculares se verá beneficiado por la degeneración de los componentes del tejido pulpar, el exudado inflamatorio que aparece en las etapas más avanzadas y por último, la saliva cuando hay una comunicación con la cavidad oral que aportará diferentes elementos para la proliferación.
- **Factores protectores del hospedero:** Son todos aquellos que frenan el ingreso, penetración y colonización bacteriana, tales como la integridad de los tejidos conectivos y dental, masticación, deglución, tejidos linfoides y saliva.
- **Interacciones Bacterianas:** Corresponde al principio que se da en los biofilms y dentro de nuestra área a nivel de conductos radiculares, en donde existe un intrincado intercambio de nutrientes entre una especie y otra. Dándose los casos en que algunos productos metabólicos pueden suprimir o hacer desaparecer otras especies (Antagonismo) o potenciar su desarrollo (Sinergismo).
- **Colonización Bacteriana:** Es un factor importante a considerar ya que si existe un mayor número de bacterias colonizando la pulpa o la zona periapical, mayor será la invasión bacteriana y por lo tanto, será acompañada de un gran infiltrado inflamatorio. Aspectos importantes a considerar son la patogenicidad de las cepas de bacterias y su capacidad de multiplicación, más que la cantidad misma. Por otro lado, las bacterias que se consideran más virulentas son aquellas que liberan más endotoxinas, exotoxinas, exoenzimas y productos metabólicos, que coincidentemente corresponden a aquellas especies que poseen una alta tasa de actividad metabólica (Aguilar, 2004).
- **Factores de Virulencia:** Corresponden a aquellos atributos de un microorganismo patógeno que permiten que infecte y dañe los tejidos del huésped, contribuyendo a la invasión y toxicidad microbiana (Mateos citado en De la Maza, 2006)
- **Endotoxinas:** Corresponde al principal factor de patogenicidad de las bacterias gram negativas como la *Porphyromona*, *Fusobacterium*. Estos componentes se encuentran en la pared celular en forma de lipopolisacáridos (LPS) y son antígenos no específicos que son neutralizados de manera deficiente por los anticuerpos. Dentro de otras capacidades está la de activar la vía del complemento sin la

participación de los anticuerpos, lo que determina la activación de cininas y la cascada de la coagulación, además de determinar la liberación de IL-1, produciendo una respuesta inflamatoria y destrucción ósea en los tejidos periapicales con pequeñas cantidades de bacterias, produciendo estasis vascular intrapulpar.

- **Exotoxinas:** Corresponde a proteínas de tipo soluble que tienen un alto peso molecular y actúan directamente en los tejidos que contactan produciendo necrosis. Poseen una acción específica
- **Exoenzimas:** Corresponden a enzimas que destruyen el tejido pulpar y periapical, permitiendo la invasión bacteriana. Ejemplos comunes son: heparinasa, fibrinolisisina, colagenasa, etc. Estas enzimas son producidas comúnmente por especies bacterianas de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptoestreptococcus*, *Fusobacterium* y *Enterococcus*.
- **Metabolitos:** Debido a la variada e intrincada red de interrelaciones bacterianas como el comensalismo, sinergismo, antibiosis y coagregación, es que se requiere de la producción de metabolitos para así regular el crecimiento de determinadas especie.

II.5 MEDIOS DE CULTIVOS

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

Para conseguir el desarrollo de los microorganismos en laboratorio, es necesario saber y otorgarle las condiciones básicas y físico-químicas en las que se desarrollan mediante un medio de cultivo (Liébana, 2002).

II.5.1 COMPOSICIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO

Los componentes más importantes que se agregan a un medio de cultivo para cumplir con las necesidades nutricionales son:

- **Agua:** Elemento básico para la vida y para la dispersión y mezcla de los nutrientes.
- **Peptonas:** Constituyen una fuente fundamental de nitrógeno, carbono y azufre. Se obtienen a través de hidrólisis ácida o enzimática de proteínas.
- **Hidratos de Carbono:** Por convención se utiliza la glucosa. Constituye una fuente de energía y carbono, luego de pasar por las vías de degradación del microorganismo.
- **Extracto de carne:** Es un concentrado de elementos hidrosolubles de composición indefinida (corazón, cerebro, músculo, hígado)
- **Extracto de levadura:** Constituye una fuente importante de aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento.
- **Cloruro de Sodio:** Equilibra la presión osmótica del medio.

- **Agentes Solidificantes:** Se incorporan al medio para darle consistencia sólida o semisólida, siendo el más utilizado el agar. Este último corresponde a un polímero obtenido de las algas rojas *Gelidium corneum*.

II.5.2 CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE UN CULTIVO

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

- **Temperatura:** Por lo general es 36 \pm 1°C
- **Atmósfera:** Esta condicionada al tipo de respiración del microorganismo. Las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, se incuban en presencia de oxígeno; por otro lado, las anaerobias estrictas necesitan de un 85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y un 5% de dióxido de carbono.
- **Presión osmótica:** concentración del 1% de cloruro de sodio.
- **Humedad:** Favorece el crecimiento de los microorganismos.
- **pH:** los pH cercanos a la neutralidad son los más favorables para la mayoría de las bacterias.

II.5.3 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Según su contenido (Liébana, 2002)

- **Definidos o sintéticos:** Corresponde a aquellos medios en donde se conoce perfectamente la composición química, ya que se elaboran con productos puros e individualizados.
- **No sintéticos o empíricos:** Corresponden a los más utilizados, ya que son los que han traído buenos resultados durante la historia de su uso (ej. Agar cerebro-corazón o agar Müeller-Hinton)

Según su estado físico (Liébana, 2002)

- **Líquidos:** Reciben el nombre de caldo o infusión. Sus 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%)

Según su utilización en laboratorio (Liébana, 2002)

- **Básicos o comunes:** Son aquellos formulados 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 el suero.
- **Selectivos:** Son aquellos que permiten el crecimiento de algunas especies y la inhibición de otras. Dicha selección puede ser mediante inhibición o por enriquecimiento.

II.6 Enterococcus Faecalis

II.6.1 GENERALIDADES

E. faecalis pertenece al género de los *enterococcus* que por lo general son bacterias esféricas u ovoides que se disponen en pares o cadenas de longitud variable. Son inmóviles y no hemolíticos. Dentro de la taxonomía están catalogados dentro del Grupo D de la clasificación de Lancefield.

Son bacterias anaerobias facultativas, coco Gram Positivo. Sus células miden entre 0.5 a 1 μm de diámetro.

Su hábitat común corresponde al tracto gastrointestinal, la cavidad oral y la mucosa vaginal en humanos como comensales comunes (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Son capaces de desarrollarse en condiciones extremas tales como NaCl 6.5%, pH 9.6 y a temperaturas que oscilan entre 10 – 45°C. Pueden sobrevivir 30 min. a 60°C y se desarrollan en presencia de 40% de sales biliares (Rodríguez, 2002). De acuerdo al estudio de Portenier y cols. La curva de crecimiento de *E. faecalis* muestra que la cantidad de células se aumenta exponencialmente durante las primeras 6 horas de incubación (fase de crecimiento exponencial); y luego, ésta disminuye entre las 24 y 36 horas, estabilizándose a partir de este momento (fase de muerte celular)

El *E. faecalis* posee un metabolismo fermentativo que convierte los carbohidratos a ácido láctico. Al no poseer ciclo de Krebs son considerados fermentadores estrictos. Además es una de las pocas bacterias que produce una gran cantidad de oxígeno extracelular (Siqueira, et al., 1997).

II.6.2 ESTRUCTURA CELULAR

Al igual que todas las bacterias de tipo gram positivas posee los mismos elementos estructurales, pero donde cobran importancia la membrana celular y los plasmidios, relacionados con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (De la Maza & Torres, 2006)

La membrana plasmática está compuesta por tres elementos fundamentales: peptidoglucano(40%), ácido teicoico y polisacáridos. La función del peptidoglucano al igual que todas las bacterias grampositivas es la de resistir el colapso inducido por altas presiones citoplasmáticas. *E faecalis* es considerado un microorganismo no capsulado, debido a su falta de “componente mucoide”; sin embargo, se han podido aislar subespecies con una cápsula de polisacáridos (De la Maza, et al., 2004).

E. faecalis puede intercambiar material genético, plasmidios, mediante conjugación inducido por pequeños feromonas peptídicas (De la Maza, et al., 2004). La presencia de proteínas de superficie como sustancias de agregación que reconocen un ligando específico en las células huéspedes asegurando una conexión exitosa para la conjugación. Además *E. faecalis* posee un pili con el cual puede guiar la formación de un biofilm (Murray, 1998).

II.6.3 IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO

Los *E. faecalis* están capacitados para desarrollarse en los siguientes medios: Agar sangre o agar chocolate a una temperatura entre 10° - 45° 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 Müller-Hinton; agar enterococose; caldo soya tripticasa. (Estrela, 1997; Ferrari et al, 2005; Pinheiro et al 2004; University of Maryland, 2000 citados en De la Maza, 2006)

II.6.4 PATOGENIA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

E. faecalis es un habitante normal de la cavidad oral, pero su número se encuentra aumentado en muestras de pacientes que están en tratamiento endodóntico inicial y los que se encuentran en la mitad del tratamiento, a diferencia de los que no presentan historia de tratamientos endodónticos (Segdley citado en Stuart, 2006)

E. faecalis se ha asociado con distintas formas de enfermedad perirradicular incluyendo las infecciones primarias y las resistentes. Dentro de la categoría de infecciones primaria, esta bacteria se ha asociado con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas. Por otro lado, la frecuencia es mucho más alta en las infecciones endodónticas persistentes, aproximadamente nueve veces más. (Rôcas, et al., 2004)

Se ha comprobado que *E. faecalis* se adhiere a las células del hospedero, expresa proteínas que permitan competir con otras bacterias y alteren las respuestas del hospedero (Stuart, et al., 2006).

Los factores de virulencia más importantes relacionados al *E. faecalis* son: *sustancias agregadoras, adhesinas, feromonas, ácido lipoteicoico, superóxido extracelular, gelatinasa, hialuronidas y citolisina (hemolisina)* (Kayaoglu & Orstavik, 2004)

- **Sustancia Agregadora:** Corresponde a una adhesina bacteriana, decodificada en los plasmidios y que posee una respuesta mediante feromonas. Esta sustancia regular el contacto eficiente entre el huésped y la bacteria, facilitando el intercambio de plasmidio.
- **Adhesinas de Superficie:** El gen *esp* presente en los enterococcus determina la producción de una proteína de alto peso molecular Esp. Dicha proteína juega un papel importante en el primer enlace para la formación de biofilm en superficies abióticas (Toledo-Arana citado en Kayaoglu, 2006).
- **Feromonas Sexuales:** Las feromonas están codificadas en los cromosomas. Son pequeños péptidos hidrofóbicos de 7 a 8 aminoácidos de largo, cuya función es la de funcionar como péptido señal dentro de *E. faecalis* (Clewel y Weaver citados en Kayaoglu, 2006).
- **Ácido Lipoteicoico:** Está muy relacionado con las moléculas anfipáticas compuestas de poliglicerolfosfato, que están por general

presentas en las superficies de las bacterias Gram positivas. Esta molécula tiene como función la unión con células de tipo eucariota como plaquetas, eritrocitos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales (Beachey citado en Kayaoglu, 2006). También se han reportado estudios en donde se ha comprobado que son capaces de inducir la apoptosis de osteoclastos, osteoblastos y fibroplastos del ligamento periodontal. Por otro lado, estimulan a los leucocitos a liberar una cantidad importante de mediadores inflamatorios tales como: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8.

- **Súperoxido Extracelular:** el anión superóxido es un radical altamente reactivo involucrado en el daño celular y tisular en una variedad de desórdenes, incluyendo enfermedades inflamatorias. Estos compuestos tienen un efecto destructivo en varios compuestos biológicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kayaoglu & Orstavik, 2004).
- **Gelatinasa:** Es una metaloproteínasa que contiene zinc, la cual puede hidrolizar la gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina, insulina.
- **Hialuronidasa:** Actúa sobre el ácido hialurónico, funcionando como una enzima degradativa asociada a la destrucción de tejido.
- **Citolisina (Hemolisina):** Corresponde a una toxina contenida en los plasmidios, que produce la destrucción de los tejidos.

II.7 PREPARACIÓN BIOMECÁNICA (PBM)

Este procedimiento se realiza por medio de la instrumentación de los conductos radiculares, complementada por la irrigación, aspiración e inundación con soluciones de irrigación, teniendo por lo tanto la función de limpieza mecánica y de acción antibacteriana en los casos de necropulpectomías y/o también la función de limpieza mecánica, aunque citofiláctica, en las biopulpectomías. Así la preparación biomecánica se puede dividir en:

- *Medios químicos:* que están representados por el uso de sustancias o soluciones de irrigación.
- *Medios físicos:* que comprenden los actos de irrigar y simultáneamente aspirar, así como inundar el conducto radicular con la solución de irrigación.
- *Medios mecánicos:* representados por la acción de corte y conformación los instrumentos, para la instrumentación de los conductos radiculares. (Leonardo, 2005)

II.8 IRRIGACIÓN

La función más importante del Irrigante del conducto radicular es la destrucción de todos los microorganismos presentes. Desde principios del siglo se han utilizado una serie de sustancias para irrigar el sistema de conductos radiculares, incluyendo soluciones químicamente inactivas (suero salino, agua, anestésico local) y materiales químicamente activos, como enzimas, ácidos, álcalis, agentes quelantes, agentes oxidantes, agentes antibacterianos (Clorhexidina) detergentes.

En endodoncia, las soluciones y sustancias más comúnmente indicadas en endodoncia (Leonardo, 2005)

Compuestos Halogenados

Solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (Líquido de Dakin)
Solución de hipoclorito de sodio al 1 % + ácido bórico (Líquido Solución de Milton*)
Solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (Licor de Labarraque)
Solución de hipoclorito de sodio al 4-6.5 % (Soda clorada doblemente concentrada)
Solución de hipoclorito de sodio al 5.25% (Preparación oficial, USP)
Solución de Gluconato de Clorhexidina al 2 %

Detergentes Sintéticos

Duponol C – al 1% (alquil-sulfato de sodio)
Zefiro** – cloruro de alquildimetil-bencilamonio (Cloruro de Benzalconium)
Dehyquart-A*** (cloruro de cetiltrimetilamonio)
Tween – 80**** (Polisorbato 80)

Quelantes

Soluciones de ácido etilendiaminotetracético-EDTA
Largal ultra* (agente quelante comercial)
Redta** (agente quelante comercial)

Asociaciones

RC Prep*** (ácido etilendiaminotetracético + peróxido de urea + base hidrosoluble e polietilenoglicol – Carbowax)
Endo-PTC**** (peróxido de urea + Tween 80 + Carbowax)
Glyde File Prep*****
MTAD – (asociación de una tetraciclina isomérica, ácido cítrico y un detergente –Tween 80)
Smear Clear*****

Otras soluciones de irrigación

Agua destilada esterilizada
Agua de hidróxido de calcio – 0.14 g%
Peróxido de hidrógeno – 10 vol.
Suero fisiológico
Solución de ácido cítrico

*Lab. Lepetit – São Paulo, SP, Brasil

** Bayer do Brasil Ind. Químicas SA.

*** Henkel International, Dusseldorf, Alemania Occidental.

**** Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, E.U.A.

II.8.1 SOLUCIONES DE IRRIGACIÓN

Estudios realizados con microscopía electrónica de barrido, muestran que la remoción de los restos orgánicos y microorganismos del conducto radicular parecen depender más de la mayor cantidad de solución de irrigación usada (volumen), que del tipo de solución utilizada, por lo tanto, independiente de su naturaleza química. (Leonardo, 2005) es la capacidad de arrastre mecánico que poseen todos los irrigantes.

II.8.2 MOMENTO DE LA IRRIGACIÓN

- *Antes de la instrumentación de los conductos radiculares:* en los casos de tratamientos endodónticos de dientes despulpados e infectados, donde la solución de irrigación que precede a la acción de los instrumentos, tiene por función neutralizar parcialmente los productos tóxicos y restos orgánicos, antes de removerlos mecánicamente.
- *Después de la instrumentación:* para mantener húmedas las paredes del conducto radicular y facilitar la instrumentación.
- *Después de la instrumentación:* para remover detritus orgánicos, principalmente restos de dentina resultante del ensanche y limado, para evitar que se acumulen sobre el muñón pulpar o sobre tejidos vivos periapicales, pues impedirán la acción beneficiosa de la medicación tópica entre sesiones. (Leonardo, 2005)

II.9 MEDICACIÓN ENDODÓNTICA INTRACONDUCTO

Este procedimiento se refiere a la colocación de un fármaco en el interior de la cavidad pulpar entre las sesiones, con el sistema de conductos radiculares (SCR) debidamente preparados, necesarias para la conclusión del tratamiento endodóntico.

Los fundamentos en los que se basa la medicación intraductal son la destrucción de los microorganismos residuales y sus toxinas y la remoción de tejido orgánico. (Stock, et al., 1996)

Los objetivos de la medicación intraconducto, así como las sustancias y técnicas utilizadas difieren entre sí en función de la situación clínica del diente en tratamiento. Es así que en dientes con pulpa vital, la contaminación bacteriana queda más bien restringida a las zonas superficiales de la pulpa coronal, por lo que una limpieza bien realizada eliminara la mayor parte de los microorganismos siendo la medicación más bien un medio de control de la inflamación. Por otra parte en aquellos dientes con pulpa necrosada, el contenido microbiano y tóxico de la cavidad pulpar determina la utilización de sustancias antisépticas coayudantes en la desinfección del sistema de conductos radiculares, sobretodo en aquellos lugares inaccesibles a la instrumentación, como las ramificaciones del conducto principal y los túbulos dentinarios.

Estos medicamentos deben ser capaces de inhibir la recolonización microbiana de las desinfectadas del SCR evitando que crezcan los microorganismos residuales, como también que tenga lugar una invasión por nuevos organismos a través de conductos laterales y por acceso coronal.

Requisitos del medicamento a utilizar (Stock, et al., 1996)

- 1) Destruir todos los microorganismos del conducto radicular.
- 2) Tener efecto antimicrobiano duradero.
- 3) No verse afectado por el material orgánico.
- 4) Ayudar a la remoción de tejido orgánico.
- 5) Penetrar en el sistema de conductos radiculares y los túbulos dentinarios.
- 6) No irritar los tejidos perirradiculares ni tener toxicidad sistémica.
- 7) Tener propiedades biocompatibles.
- 8) Inducir una barrera de calcificación en la unión con los tejidos perirradiculares.
- 9) No tener efecto en las propiedades físicas del material de obturación temporal.
- 10) No difundir a través del material de obturación temporal.
- 11) Fácil colocación y remoción ser radiopaco.
- 12) No producir tinción dental.

La elección del medicamento a utilizar dependerá de varios factores a considerar:

- **Cantidad y concentración** del agente antiséptico; para ejercer su efecto deseado sin lesionar los tejidos circundantes.
- **Localización**; Llegar al lugar en el que debe actuar el medicamento además de que es indispensable tener en cuenta el mecanismo de acción del agente que determinara la forma apropiada para su colocación.
- **Tiempo de aplicación** donde es indispensable saber el tiempo de vida media del agente antiséptico, después del cual su efecto se reduce o desaparece.

II.10 HIDRÓXIDO DE CALCIO (CA (OH)₂)

Este medicamento representa un complemento de la terapia endodóntica, es utilizado en diversas situaciones clínicas por su poder antiséptico y su capacidad de estimular o crear condiciones favorables para la reparación tisular. Se considera eficaz contra la mayoría de los patógenos del conducto radicular.

Fue introducido para su uso en endodoncia por B. W. Herman, en 1920. Se presenta como un polvo blanco, alcalino, poco soluble en agua (1.7 g/L). Es utilizado ampliamente en la terapia endodóntica, por su propiedad de disociación en iones calcio e hidroxilo. Para ser utilizado como medicación, el Hidróxido de calcio de mezcla con un vehículo preferentemente acuoso o hidrofílico (agua estéril, solución fisiológica, propilenglicol, polietilenglicol), para conformar una suspensión con pH aproximado de 12.4. La presencia de agua es indispensable para que se produzca la disociación iónica. (Soares & Goldberg, 2003)

Mecanismo de acción

El empleo de este medicamento intraconducto en necrosis pulpares, es fundamentada por su reconocida acción antiséptica, determinada por su elevado pH. Es así que al ser colocado en el interior del conducto radicular, en contacto directo con las paredes dentinarias, se genera en presencia de agua la ionización del hidróxido de calcio; con la consiguiente, alcalinización del medio. Los iones hidroxilos modifican el pH de la dentina, lo que provoca la destrucción de la membrana celular de las bacterias y de sus estructuras proteicas. Además la generación de este medio altamente alcalino, modifica el medio ambiente y dificulta la supervivencia de la mayoría de los microorganismos endodónticos (Soares & Goldberg, 2003).

El hidróxido de calcio es capaz de actuar sobre las endotoxinas bacterianas: hidroliza la porción lipídica del liposacárido bacteriano (LPS), presente en la pared celular de las bacterias anaerobias gramnegativas, y neutraliza su acción estimulante sobre el proceso de reabsorción del tejido óseo. (Soares & Goldberg, 2003)

Estrela et al, reportaron que el hidróxido de calcio presenta dos propiedades enzimáticas: la primera, de inhibir enzimas bacterianas generando efecto antimicrobiano y la segunda, de activar enzimas de los tejidos, como la fosfatasa alcalina, conduciendo al efecto mineralizador. (Estrela, et al., 1995)

Requisitos para su empleo

Para que el hidróxido de calcio pueda ejercer su acción antiséptica, es necesario que el conducto se encuentre conformado, seco y con su permeabilidad dentinaria restablecida, este último aspecto se logra al irrigar el conducto con EDTA, que tiene como objetivo eliminar el smear layer, que queda luego de la preparación mecánica de los conductos sobre las paredes del conducto, reduciendo la permeabilidad dentinaria.

Tiempo de permanencia

El hidróxido de calcio cuando entra en contacto directo con las bacterias, tiene un efecto rápido y eficaz. La mayoría de las bacterias son eliminadas en un período máximo de 10 min. Sin embargo, cuando las bacterias se encuentran en la masa dentinaria es necesaria la difusión de los iones hidroxilos a través de los túbulos. En consecuencia se crea un medio inapropiado para la supervivencia de la mayoría de las bacterias que suelen estar presentes en las infecciones de origen endodóntico. Son varios los factores que pueden dificultar la difusión del hidróxido de calcio a través de la dentina, como es la reducida cantidad de agua, indispensable para la ionización, la acción buffer de la hidroxiapatita, el smear layer. Por otra parte, la difusión iónica a través de la dentina puede estar determinada por factores intrínsecos al tipo de diente, como son la cantidad y diámetro de los túbulos dentinarios. Es así, que en el tercio apical la difusión se produce con más lentitud que en la región cervical, ya que en la primera existe un menor número y diámetro de los túbulos dentinarios. El tiempo de permanencia óptimo como medicación intraconducto es de 7 días, y podrá dejarse por periodos mayores en torno a los 30 días en aquellos casos de grandes lesiones periapicales o reabsorciones nítidas.

Nerwich et al, estudiaron los cambios de pH en la dentina radicular de dientes humanos extraídos, luego de ser sometidos a medicación intraconducto con hidróxido de calcio por un período de tiempo de 4 semanas. Concluyendo que esta sustancia requiere de 1 a 7 días para alcanzar la dentina radicular externa y que en el tercio cervical, se observo valores más altos de pH que en el tercio apical. (Nerwich, et al., 1993)

Este medicamento es irritante si se extravasa y puede producir necrosis localizada, autolimitante. La extravasación puede ir acompañada de dolor intenso durante 12 – 24 hrs. (Stock, et al., 1996)

Fracaso endodóntico

El *Enterococcus faecalis*, bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, es capaz de tolerar medios ambientes de pH elevados y está presente en los fracasos endodónticos, es resistente a la acción antiséptica del Hidróxido de calcio, por lo que no es aconsejable emplearse en casos de retratamientos, siendo el empleo de otro antimicrobiano solo o asociado a Hidróxido de calcio lo recomendable.

Love, investigó el posible mecanismo capaz de explicar la capacidad del *E. faecalis* de sobrevivir y crecer dentro de los conductos radiculares y reinfectar un conducto radicular obturado. Se observó que su factor de virulencia, puede estar relacionado a la habilidad para invadir los conductos radiculares y adherirse al colágeno. (Love, 2001)

Evans et al, confirmo que el *E. Faecalis* es resistente al hidróxido de calcio en pH igual o inferior a 11.1. Por una respuesta de adaptación al pH alcalino y a la síntesis de proteínas inducidas por stress las que parecen tener un rol menor en la supervivencia celular, mientras que el funcionamiento de la bomba de protones, que tiene la capacidad de acidificar el citoplasma, tiene un rol más crítico en su supervivencia. (Evans, et al., 2002)

II.11 CLORHEXIDINA (CHX)

Se utilizó por primera vez en Gran Bretaña en 1954, como antiséptico para heridas de piel, y en Odontología en 1959, en forma de enjuagues de gluconato de clorhexidina.

Cuando se ingiere se elimina casi totalmente por las deposiciones, la cantidad mínima absorbida por el tracto intestinal, se elimina por los riñones y el hígado, y no hay evidencia de que pueda permanecer retenida en el organismo.

Su uso por largos periodos determina efectos colaterales que son reversibles, como pigmentación de la lengua, dientes y restauraciones, descamación de la mucosa oral, además de síntomas subjetivos como sabor amargo, sensación de quemadura o ardor e interferencia en la sensación gustativa. (Leonardo, 2005)

Basándose en datos recopilados de muchos estudios, los agentes inhibitorios de la placa más eficaces dentro de los antisépticos, son aquellos cuya acción persiste en la boca por varias horas, propiedad denominada sustantividad. (Lindhe, et al., 2000)

La CHX es el mejor ejemplo de Sustantividad ya que tiene la capacidad de mantener su efecto durante un tiempo prolongado que se basa en la adsorción sobre las superficies orales (superficie dentaria, película adquirida, placa bacteriana y mucosa, lo que permite una liberación constante) (Jones, 2000)

Estructura química

Este agente es una bisguanidina bicatiónica a niveles de pH de más de 3.5, su molécula es simétrica y consiste en dos anillos 4 clorofenil y dos grupos bisguanidinas, conectados por una cadena central de hexametileno (Jones, 2000), con dos cargas positivas en cada extremo. (Lindhe, et al., 2000) como se aprecia en Figura 1.

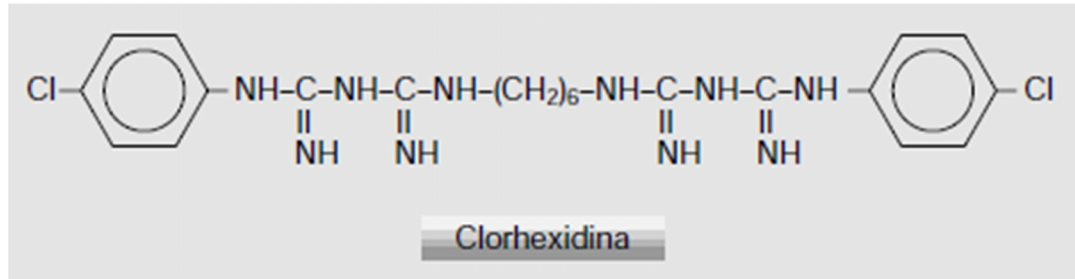


FIGURA 1.- Molécula de Clorhexidina (FLÓREZ, ET AL., 1997)

Se presenta en tres formas: acetato, hidrocloreuro y digluconato, siendo ésta última forma la más estable y la preparación más común para su alta solubilidad en agua. (Lindhe, et al., 2000)

La solución de clorhexidina, se encuentra en diferentes concentraciones, es utilizado como antiséptico bucal en forma de enjuagues, irrigación subgingival, gel, dentífricos o chiclets. Se emplea para el control de biofilm oral, también se recomienda en diversas concentraciones en la irrigación de conductos radiculares.

Mecanismo de Acción

Los antisépticos más eficaces tienen como característica detener o retrasar la proliferación bacteriana. En estudios realizados con clorhexidina, se demuestra que los agentes inhibitorios más eficaces dentro de los antisépticos son aquellos que conservan sus características durante varias horas, a esta propiedad se le conoce con el nombre de sustantividad (Lindhe, et al., 2000).

La CHX presenta un amplio espectro de acción sobre microorganismos Grampositivos y Gramnegativos, hongos, anaerobios facultativos y aerobios. (Bascones & Manso, 1994)

Su acción antimicrobiana, puede ser explicada por la carga negativa de la célula bacteriana. Esto permite que la molécula de CHX sea atraída a la superficie de la bacteria, presentado una adsorción fuerte y específica a los componentes fosfatados, alterando el equilibrio osmótico que afecta la integridad de la membrana celular de las bacterias. Esta atracción de la CHX hacia los fosfolípidos de la membrana interna, aumenta la permeabilidad, permitiendo la filtración de moléculas de bajo peso molecular como el ion potasio. (Jones, 2000)

La acción de la CHX sobre los microorganismos va a depender de su concentración, es así que a bajas concentraciones el agente es bacteriostático, en cambio a altas concentraciones es bactericida. (Jones, 2000)

Su efecto bacteriostático determina que sustancias de bajo peso molecular, como el potasio y el fósforo pueden disgregarse ejerciendo un efecto bacteriostático. Este efecto ocurre debido a la lenta liberación de la clorhexidina. Se ha dicho que este efecto es de mayor importancia que el efecto bactericida. (Fardal & Turmbull, 1986)

Su efecto bactericida induce la precipitación o coagulación del citoplasma celular. La acción antimicrobiana de la clorhexidina se debe a que es absorbida por

la pared celular causando rotura y pérdida de los componentes celulares. (Yesilsoy, et al., 1995)

La alteración de permeabilidad de la membrana citoplasmática causa precipitación de proteínas plasmáticas por la alteración del balance osmótico de la célula, interfiere en el metabolismo, crecimiento, división celular, inhibe la enzima ATP asa e inhibe el proceso anaerobio.

Los resultados del estudio realizado por Delany et al. (1982) sostienen que la solución de clorhexidina al 0,2% es un agente antimicrobiano efectivo cuando es utilizada como solución irrigante de los conductos radiculares produciendo una drástica reducción de la flora bacteriana dentro del conducto radicular luego de la instrumentación. (Delany, et al., 1982)

Silva y cols, determinaron la efectividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio al 1% y de la clorhexidina al 2% como irrigantes endodónticos, en un estudio en vivo en dientes con conductos infectados. Los resultados que obtuvieron indicaron que ambos irrigantes poseen igual potencial antimicrobiano como acción inmediata, no obstante la clorhexidina es más eficiente en su actividad residual a los 7 días. (Silva, 1999)

En un estudio in vitro realizado por Leonardo et al. (2001), la solución de gluconato de clorhexidina al 2,0% ejerció su actividad antimicrobiana sobre microorganismos que han sido asociados a casos de infecciones endodónticas persistentes o resistentes al tratamiento, como el *Estafilococos aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Estafilococos epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, y *Cándida albicans*.

En 2001 Ferraz et al., realizaron un estudio con la finalidad de evaluar la acción antibacteriana del gluconato de clorhexidina gel al 2%, y la solución de hipoclorito de sodio al 5,25 %, en conductos radiculares contaminados in vitro con *Enterococcus faecalis*. Los resultados de este estudio demostraron que la clorhexidina tuvo una actividad antibacteriana similar a la del hipoclorito de sodio. (Ferraz, 2001).

II.12 PROPÓLEO

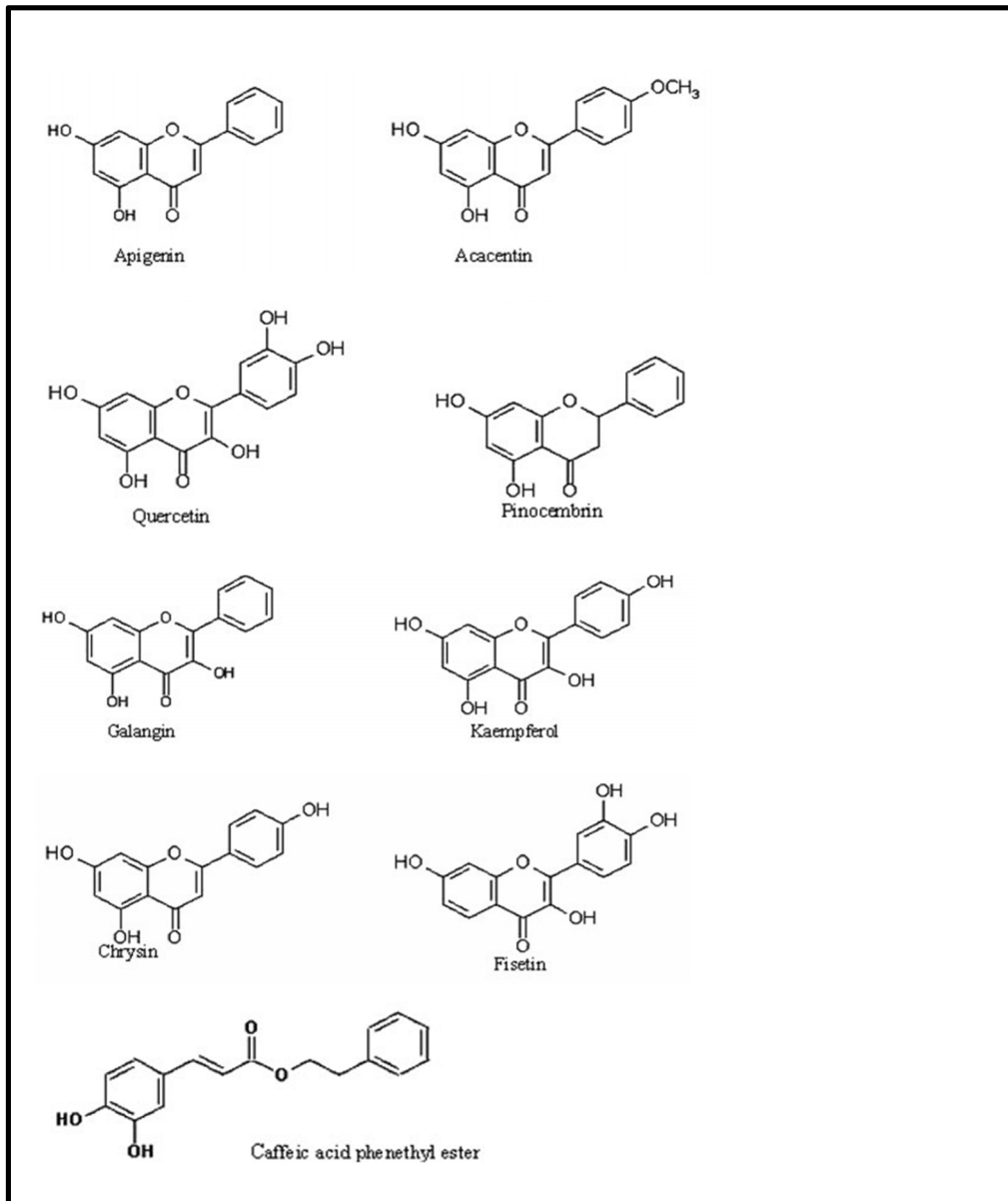


FIGURA 2.- Estructura química de flavonoides más importantes

El propóleo es una sustancia embalsamadora de carácter resinoso recolectado por las abejas como exudado de plantas, responsable de la baja incidencia de bacterias dentro de la colmena de las abejas lugar donde el propóleo es usado como constituyente, sellante y embalsamador (Vuida-Martos., et al., 2008) de paredes y microorganismos ajenos a la comunidad de abejas; y aunque no se conoce en su totalidad el mecanismo de acción; sus cualidades antimicrobianas se atribuyen al sinergismo de sus compuestos tales como los flavonoides (Figura 2) conocidos como los abanderados de estas cualidades; junto con otros compuestos como ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos, y otros compuestos fenólicos presentes en su composición (Premoli, et al., 2010).

No por nada el origen griego “pro” en defensa, y “polis” ciudad; destaca la función primordial del propóleo en la colmena y avala el uso que se le dio desde tiempos antiguos donde los egipcios lo usaban en ungüentos de embalsamamiento, Aristóteles lo proyectó como remedios para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones; Galeno al mencionarlo en sus trabajos como un buen cicatrizante también destacó sus cualidades medicinales; condición que compartió el médico, filósofo y científico persa Avicena y más cercanamente los Incas para el alivio de cuadros de infección febril (Hegazi, 1997)

Los Flavonoides corresponden a pigmentos naturales ampliamente distribuidos en plantas, frutas y verduras los que tienen como característica el ser esenciales para nuestro organismo al no ser producido por este y necesitarse de la ingesta de los mismos para contar con ellos dentro de los procesos fisiológicos de inmunidad entre otros. Estos pigmentos son sintetizados a partir de aminoácido fenilalanina, tienen características fluorescentes cuando son excitados por luz UV y son de utilidad para botánicos en la clasificación taxonómica. (Pérez Vallejo, et al., 2006). Son los botánicos los que han mencionado que flavonoides que contienen un importante aporte de pinocembrina y galagina (género *Pópulus*) (Figura III-2); presentan una mayor actividad antimicrobiana que aquellos de origen botánico mixto que contienen derivados de ácidos diterpénicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato. (Popova, et al., 2005)

Aun así, con el tiempo, el propóleo fue quedando de lado cuando las ciencias médicas se enfocaron en la producción y perfeccionamiento de fármacos como la penicilina. Sin embargo, en los últimos años la medicina se ha vuelto a reencontrar con derivados naturales (Pérez Vallejo, et al., 2006) que tienen propiedades medicinales. Los estudios ahora están enfocados a determinar objetivamente el potencial de su uso en un nivel mucho más específico de lo que se venía haciendo y la Odontología ha incorporado el Propóleo en varias especialidades. Desde hace 30 años han indagando la acción antimicrobiana del propóleo a nivel periodontal (Pérez Vallejo, et al., 2006) y endodóntico (de Andrade, et al., 2007), (Victorino, et al., 2010), (Oncag, 2006), también se han hecho pruebas de su comportamiento en comparación con otros medicamentos cuya experiencia ya ha sido probada obteniendo resultados que permiten ampliar la gama de materiales dentales desde hace 30 años (Bankova, 2005) esta vez; a costa de un producto facilitado por la naturaleza.

En 1995, Marcucci determina la composición del propóleo químicamente en grupos de aldeídos, ácidos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ésteres aromáticos, chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares (Marcucci, 1995). Además comprueba que el lugar geográfico de extracción del propóleo es un factor a considerar a la hora de intentar estandarizar la composición del propóleo.

Baknova et al. 2000 determinó que la composición del propóleo en lo que se refiere al aporte de las abejas, no cambia y se mantiene constante sin importar la localización geográfica de estas. El problema se presenta al no tener claro o aún en

discusión, los componentes activos del propóleo, caso en el cual, se toma como principio activo al extracto en su totalidad.

Así, el propóleo extraído de lugares más tropicales no presentan el mismo contenido que los extraídos de otros lugares, diferenciándose por ejemplo en la ausencia del ácido cafeico fenil ester (CAPE); un componente categorizado como principio activo del propóleo, que no está en el propóleo procedente del trópico. Este ejemplo es emulado por otros compuestos, situación ante la cual una pregunta destaca de forma insoslayable; ¿es posible una estandarización química válida ante una sustancia tan variable en su composición como lo es el propóleo?

La respuesta específica para esta pregunta es no; pero el objetivo de lograr una estandarización para el propóleo sí es posible, en la medida que podamos especificar la planta de la que el propóleo fue extraído. De esta manera tendremos disímiles tipos de propóleo determinados por su planta de origen que en definitiva estará caracterizado por grupos de principios activos en lugar de clasificar el propóleo según componentes individuales. (Bankova, 2005)(Tabla I).

Baknova 2005, determino cuales eran los compuestos químicos responsables de estas propiedades biológicas y comparo a 4 de ellos (Tabla I). Una conclusión lógica sería pensar que cada propóleo va a tener diferentes propiedades según su composición, lo cierto es que no es así. Por supuesto que los propóleo son distintos pero la función de cada uno de ellos en la colmena es la misma.

Tipo de propóleo	Origen Geográfico	Planta (fuente)	Principal principio biológicos activos	Referencia
Pr. álamo	Europa, América del norte, regiones de Asia no tropicales	<i>Pupulus spp. Aigeiros, P. Nigra L.</i>	Flavones, flavonones, ácidos cinámicos, y ésteres.	Nagy et al. (1986) Greenaway et al. (1990) Baknova et al. (2000)
Pr. abedul	Rusia	<i>Betula verrucosa Eht.</i>	Flavones, flavonones (diferentes a los del pr. Álamo)	Propravko y Sokolov (1999)
Pr. verde	Brasil	<i>Baccharis spp, B. dracunculifolia DC.</i>	Ácido Prenylated p_coumaric, ácidos diterpénicos	Marcucci y Baknova (1999)
Pr. rojo	Cuba, Venezuela	<i>Clusia spp.</i>	Poliprenylated benzofenonas	Cuesta Rubio et al. (2002) Trusheva et al. (2004)
Pr. pacífico	Regiones del pacífico (Okinawa, Taiwan)	<i>No conocido</i>	C. prenylflavononas	Chen et al. (2003) Kumazawa et al. (2004)
Pr.canarias	Islas Canarias	<i>No conocido</i>	Furofuran lignanas	Christov et al. (1999)

TABLA I.- TIPOS DE PROPÓLEO DETERMINADOS POR SU PLANTA DE ORIGEN

Las características antimicrobianas en el propóleo están dadas por el sinergismo natural de las sustancias ilustradas en la Figura 2 más que en el actuar diferenciado de cada uno de ellos por individual (Duarte, et al., 2003).

Y dentro de los componentes con actividad antimicrobiana más importantes del propóleo, están:

Pinocembrina: actividad antibacteriana, fungicida, y de utilidad como anestésico local. (Pérez Vallejo, et al., 2006)

Acacetina: propiedades antiinflamatorias (Bankova, 2005). Recientemente se vio gran poder de inhibición del citocromo P450 que estaría involucrado en el metabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos y hormonas, razón por la cual se especula su importante rol en el desencadenamiento de algunos tipos de cáncer siendo detectado en muestras de tejido cancerígeno (Doodstar, et al., 2000).

Conferido: Pérez Vallejo 2006 cita a Yannai 1998 quien describe este componente como un promisorio agente antibacteriano al inducir directamente quinona reductasa y otras enzimas protectoras, sin promover la acción de otros cancerígenos.

Galangina: es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se ha encontrado en el propóleo y presenta actividad antiinmunogénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas, pero se destaca principalmente por su capacidad antigénotóxica como potente agente quimiorreceptor frente al cáncer. Además de poseer actividad antimicrobiana. (Pérez Vallejo, et al., 2006)

Ácido cafeico fenil ester: posee mecanismo de acción que probablemente se basa en la inhibición del ARN polimerasa bacteriana. (Pérez Vallejo, et al., 2006)

La actividad antimicrobiana del propóleo abarca un amplio rango de bacterias, virus, hongos, y levaduras con distintos radios de alcance.

II.12.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Hegazi, 1997 cita a Chernyak, recordando su investigación de 1973 en la que se comprobó la actividad antibacteriana del propóleo ante cultivos de 20 *Staphylococcus*, 10 *Streptococcus* y 10 *Escherichia coli* usando concentraciones de 1,25 a 5mg de propóleo /ml demostrando fuerte actividad antibacteriana ante 25 de las bacterias probadas. Muchos estudios destacan las acciones del propóleo frente a bacterias Gram positivas y negativas, conociéndose cierta inclinación de este extracto hacia las bacterias Gram positivas y cierta limitación ante bacilos Gram negativos. En concentraciones de 1.5 a 3mg/ml pudieron dar muerte a *Staphylococcus* y *Escherichia coli*, en *Shigella sonnei* a 1.5 mg/ml y con la *Salmonella* fue a 3-5 mg/ml.

Takasi et al. (1994) afirmó que el propóleo inhibe el crecimiento bacteriano y previene la división celular. Además este extracto desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular, causando bacteriólisis parcial e inhibe la síntesis proteica (Takasi, et al., 1994).

II.12.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Iorich et al. (1965) demostró que el propóleo tiene acción in vitro contra el virus de la influenza tipo A (H3N2). Se observó que el potencial máximo de inhibición de la producción vírica se obtuvo durante y en la mitad de todo el proceso infeccioso.

El extracto tuvo menor efecto in vivo y solo cuando fue administrado antes de la infección (Iorich, et al., 1965).

II.12.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA:

Cizmarik y Trupl (1976) testearon la actividad inhibitoria del propóleo sobre *Aspergillus sulphureus* y sobre otros hongos. El extracto etanólico del propóleo inhibió 60 cepas de levaduras y 38 cepas de hongos (Cizmarik & Trupl, 1976).

Milena, et al (1989) encontró efecto fungistático en el extracto de propóleo (Milena, et al., 1989).

Es importante el número de estudios que se han dedicado a la obtención de conocimiento en las funciones que el propóleo podría prestar a la odontología.

El uso clínico del propóleo como coadyuvante del tratamiento periodontal es relatado por un sinnúmero de autores citados por Pérez, 2006 y Gebara, 2002 comprobando su acción antimicrobiana contra patógenos periodontales como *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*; *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*. (Gebara, et al., 2002).

Por otro lado la ciencia endodóntica destaca el efecto antimicrobiano del propóleo en los estudios de (Hegazi, 1997), (Oncag, 2006) (de Andrade , et al., 2007) (Victorino, et al., 2010) (Vuida-Martos., et al., 2008), entre otros. En Europa es usado como componente farmacéutico en productos cosméticos como en preparaciones antiacné, cremas faciales, lociones, etc. (Pérez Vallejo, et al., 2006).

Y en nuestro país se comercializa como comprimidos de 120mg, jarabes al 10% así como gotas al 10% y spray. Cada uno de ellos propuestos para fortalecer los mecanismos de inmunidad de nuestro cuerpo a nivel sistémico. En particular el spray se indica para afecciones de faringe, y las gotas para para la aplicación directa sobre la zona afectada.

Son pocos los efectos adversos que pueden llevar al propóleo a una descripción de contraindicación y se refieren casi exclusivamente a reacciones alérgicas por hipersensibilidad tipo dermatitis por contacto (Fernandez, et al., 2004). Se sospecha del componente 2- butenil cafeato y fenil cafeato (Pérez Vallejo, et al., 2006) como responsable de las reacciones alérgicas aunque es muy probable que aun no se conozcan todos los componentes involucrados. Se describen según Pérez Vallejo, 2006 que los cuadros más comunes son dermatitis en zonas palmares y dedos, reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis orales agudas con ulceraciones.

III. MATERIALES Y MÉTODO

III.1 HIPÓTESIS.

La solución de Propóleo 10 mg/ml presenta mejor actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* presente en conductos de dientes naturales que con Clorhexidina al 2% e Hidróxido de Calcio 5 mg/ml.

III.2 OBJETIVOS

III.2.1 GENERAL.

Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del propóleo contra el *Enterococcus faecalis*.

III.2.2 ESPECÍFICOS.

- Comparar la acción antibacteriana del propóleo contra el *Enterococcus faecalis*, con la acción de la Clorhexidina 2% en dientes naturales como reservorio bacteriano.
- Comparar la acción antibacteriana del propóleo contra el *Enterococcus faecalis*, con la acción del Hidróxido de Calcio en dientes naturales como reservorio bacteriano.

III.3 VARIABLES

Variables independientes

- Hidróxido de calcio consistencia lechada de cal dental
- Clorhexidina al 2%
- Propóleo a 10mg/ml (diluido en etanol)

Variables dependientes

- Unidad Formadora de Colonia (de *E. faecalis*)

III.3.1 DEFINICIONES CONCEPTUALES/ OPERACIONALES.

Hidróxido de calcio: Medicamento intraconducto que actúa mediante la disociación de iones Ca e OH para la reparación de tejido por medio de la alcalinización del medio y destrucción de microorganismos por su alto pH. Se presenta en vehículo con suero fisiológico.

Propóleo: Extracto de la producción apícola con funciones estructural, de sellado, de embalsamado y defensivas dentro de la colmena de las abejas con uso en la medicina y odontología como antimicrobiano. Tiene presentación en solución de 5mg/ml.

Clorhexidina: Agente antimicrobiano bactericida y bacteriostático empleado dentro de conductos radiculares, de características dicatiónicas que se presenta en solución al 2%.

UFC: unidad formadora de colonia. Variable cuantitativa continua que se expresará en N° de bacterias x 10⁶. Grado de contaminación bacteriológica de un ambiente. Es el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio agar semisólido. Usa el orden de decena de millones de células descendientes. Su unidad de medida será UFC/mL.

III.4 DISEÑO

Estudio experimental (ECC) in vitro aleatorizado en el que se utilizan tres variables independientes y una variable dependiente.

Se seleccionan 45 dientes extraídos recolectados en consultorios de Viña del Mar y Valparaíso y clínica de pregrado Universidad de Valparaíso, según criterios de inclusión y exclusión.

III.5 UNIVERSO

Dientes extraídos en consultorio de Viña del Mar y Valparaíso y en la Clínica de pregrado de la Universidad de Valparaíso esterilizados e inoculados con *E. faecalis*. ATCC 29212

III.6 MUESTRA

Para la determinación de la cantidad de dientes para el estudio, se utilizó el método análisis de varianza a un factor fijo, para esto se considera la probabilidad de error tipo II que es:

$$\beta = 1 - P(\text{Rechazar } H_0/H_0 \text{ es falsa}) \quad (1.1)$$

Para evaluar la probabilidad descrita anteriormente se utilizan las curvas características de operación que se presentan en el anexo A, Estas curvas se grafica la probabilidad de la ecuación (1.1) contra un parámetro Φ^2 , donde:

$$\Phi^2 = \frac{n \cdot D^2}{a \cdot \sigma^2}$$

Donde:

- σ^2 : Es la varianza de la variable en estudio a nivel poblacional.
- a : Es el número de grupos a evaluar (3 grupos).
- n : Es el tamaño de la muestra por grupo.
- D : Es la diferencia máxima entre dos tratamientos cualesquiera.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

Se consideró como valor de la varianza poblacional igual a 41,76 (Desviación Estándar = 6,462). Detectando diferencias máximas entre los tratamientos de 10. Considerando una potencia del test del 95% y un nivel de significancia del 5%, se determinó que el tamaño mínimo adecuado de la muestra fuera de por lo menos 14 dientes por grupo.

III.6.1 ASIGNACIÓN DE SUJETOS A TRATAMIENTOS

Grupo 1 – Hidróxido de Calcio						
5	6	9	15	21	22	24
26	30	32	34	35	41	42
43						

Grupo 2 – Clorhexidina						
1	2	3	8	13	14	16
17	18	25	27	28	36	40
44						

Grupo 3 – Propóleo						
4	7	10	11	12	19	20
23	29	31	33	37	38	39
45						

III.6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Dientes definitivos
2. Dientes unirradiculares y conducto único
3. Dientes con o sin destrucción coronaria pero con raíz indemne
4. Raíz recta
5. Ápice formado en su totalidad
6. Dientes sin tratamiento endodóntico previo
7. Dientes sin conducto atrésico

III.6.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Fractura de la raíz.
2. Dientes con conducto atrésico
3. Diente con conducto esclerosado
4. Diente con doble conducto

III.6.4 UNIDAD DE ESTUDIO

Corresponde a los dientes que pasaron los criterios de inclusión/exclusión y que se encontrarán montados listos para empezar las etapas de laboratorio.

III.7 CALIBRACIÓN

Se realizará una Calibración de Consistencia (Autocalibre), ya que un solo operador ejecutará una etapa de los pasos de laboratorio.

III.8 PROCEDIMIENTO

III.8.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Odontológicas de la Universidad de Valparaíso donde los 45 dientes fueron almacenados en agua oxigenada. Luego se procedió a realizar una minuciosa limpieza externa con Ultrasonido Cavitron, Dentsply®, EE.UU. y los sitios que presentaban caries fueron eliminados con piedras de diamante redondas estériles. Posteriormente se llevó a cabo la preparación dentaria donde se realizó la apertura endodóntica con alta velocidad, siguiendo los patrones de apertura endodóntica según el diente (anatomía coronaria). Se perforó hasta llegar a la cámara pulpar del diente con fresa de carbide redonda estéril, una vez obtenido el acceso a la cavidad pulpar, se debridó con lima K N°15 Maillefer®, se removieron los restos de pulpa con extirpadores pulpares Maillefer®, y se exploró el conducto con lima K N°15.

Con el fin de obtener un diámetro adecuado del sistema de conducto radicular, se aumentó el diámetro de este hasta el diámetro de la lima K N°45 Maillefer®, con el fin de facilitar, al momento de la inoculación, la penetración del medio de cultivo junto con las cepas bacterianas hasta el ápice radicular (Figuras 3, 4 y 5).



FIGURA 3, 4 y 5.- Preparación campo operatorio, apertura cameral y preparación intracanal.

Entre el uso de cada lima se utilizó como irrigación desinfectante Hipoclorito de sodio al 2,5%.

Todos los dientes fueron sellados con resina compuesta fluida Tetric Ceram Dentsply®, en la zona apical. Los 45 dientes fueron montados en una base acrílica cilíndrica para cuya confección se utilizó un anillo de cobre cilíndrico de 1cm de diámetro y 2,5 cm. de alto el cual fue recubierto con vaselina líquida y se ubicó sobre loseta de vidrio. Se preparó acrílico de autocurado en estado líquido y se llevó en una espátula al interior del cilindro. En estado plástico se posicionaron los dientes.

Después, los dientes fueron envasados en grupos de 5 unidades en sobres de esterilización y llevados a la central de esterilización de la Universidad de Valparaíso donde fueron esterilizados con el fin de evitar la contaminación de las muestras de cultivo, debidamente fiscalizados por medio de la verificación de los indicadores de viraje

Luego los dientes fueron rotulados en base a la asignación aleatoria dada por el software EPIDAT 4.0.

III.8.2 LABORATORIO.

Esta etapa fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, bajo la dirección del Dr. Jorge Torres, docente Titular de la cátedra de microbiología. Todos los procedimientos que se realizaron en este laboratorio contaron con todas las medidas de asepsia óptimas obtenidas mediante la desinfección del campo operatorio con alcohol al 70° y el uso de instrumental estéril.

III.8.3 ETAPA DE PREPARACIÓN DEL EXPERIMENTO.

Se solicitó al ISP (Departamento Laboratorio Biomédico Nacional de Referencia Sección de Bacteriología General) la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*American Type Culture Collection*) mediante un formulario de solicitud de venta de cepa bacteriana (Figura 6).

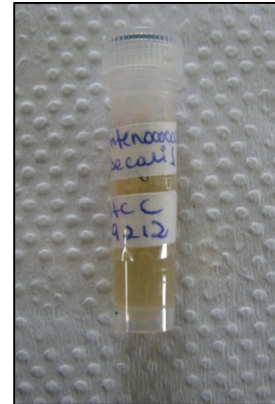


FIGURA 6.- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Al mismo tiempo se realizó la orden de compra de insumos de laboratorio al Laboratorio Linsan S.A. y al Laboratorio Vimaroni.

La cepa pura fue cultivada en Agar Sangre en cámara de cultivo a 37°C por 24 hrs. (Figura 7). Posteriormente se

extrajo una muestra desde la placa y se preparó en un matraz estéril de 100ml, 20ml para la preparación del caldo de cultivo de Cerebro-corazón (Biomark®) por 24

hrs. en estufa a 37°C, según las instrucciones del fabricante (Figura 8). Para comprobar la presencia exclusiva de la cepa *Enterococcus faecalis*, se realizó una tinción Gram que fue revisada al microscopio óptico y un medio de control.



FIGURA 7.- Placa con 1° siembra

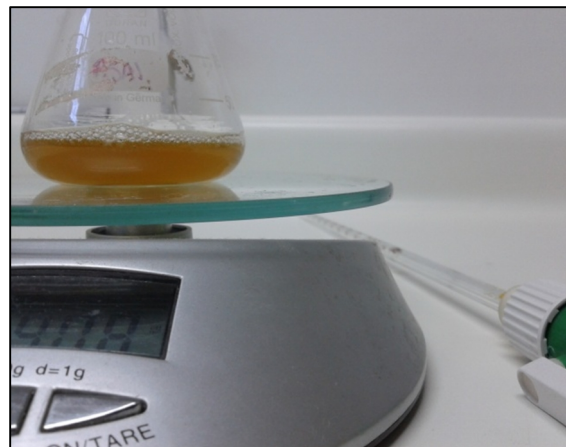


FIGURA 8.- Caldo Preparado

INOCULACIÓN DENTARIA.



FIGURA 9.- Inoculación del caldo en dientes estériles

El caldo de cultivo con la cepa *Enterococcus faecalis* fue inoculado en los 45 dientes estériles. La inoculación se realizó por medio de una jeringa de insulina estéril, ya que se presentaba como la mejor opción al tratarse de una aguja de poco calibre, por lo tanto, permitía la inoculación del interior del conducto radicular. Posteriormente estos dientes fueron sellados con cemento temporal estéril, y llevados a estufa de cultivo por 24hrs. a 37°C (Figura 9)

CULTIVO BACTERIOLÓGICO PRETRATAMIENTO.

Se realizó la eliminación del cemento temporal con instrumental estéril y se tomó una muestra para cultivo bacteriano por medio de un cono de papel estéril N°15, este cono fue humedecido con suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo estéril y se colocó en el conducto radicular hasta llegar al ápice, se llevó para agitación en Vórtex Mixer® y se mantuvo allí por 1 minuto. Pasado el tiempo se retiró y se introdujo en un tubo de ensayo previamente flameado, que contenía suero fisiológico estéril rotulado como solución Directa de 9 ml. (Figuras 10, 11 y 12)



FIGURAS 10,11 y 12.- Desobturación, Cultivo y Colocación en tubo de ensayo.

Previamente se tenían preparado 4 tubos de ensayo estériles con 9 ml. de suero fisiológico estéril, los cuales se designaron como tubos de Dilución y fueron rotulados como tubos 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , (relacionado con el factor de dilución). Según técnica de diluciones para experimentación microbiológica detallada en investigación de De la Maza, Torres y cols, 2006. Además se debió contar con 4 placas Petri con agar sangre a las cuales también se les asignó el nombre según el tubo del cual fue sacado el contenido a sembrar, siendo estas placas 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , respectivamente.

Luego, de cada tubo retiró 0,1 ml. Los que fueron sembrados en una placa de agar sangre y dispersados en la totalidad de su superficie con un asa de siembra para obtener una dispersión uniforme de la muestra. Se obtuvieron 4 placas sembradas con las distintas diluciones, las cuales fueron llevados a la estufa de cultivo manteniéndolas allí por 24hrs. a T° constante de 37°C (Figura 13).

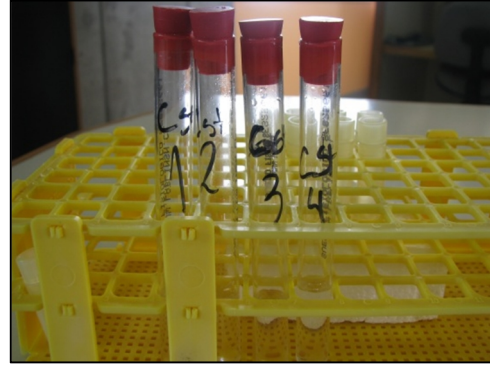
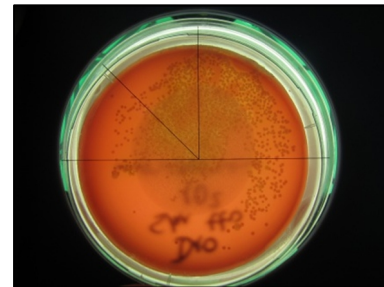
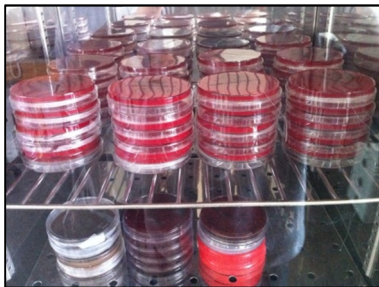


FIGURA 13.- Diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4

Cuando el tiempo de incubación fue cumplido, las placas fueron extraídas, analizadas y, mediante Colony Counter®, las colonias de la cepa fueron contabilizadas y registradas (Figuras 14, 15 y 16).

Se colocaron los dientes por segunda vez en la estufa por 24 hrs. para lograr crecimiento bacteriano, sellados en su apertura coronaria con mota de algodón estéril.



FIGURAS 14, 15 y 16.- Placas en estufa, Conteo de UFC y Recuento Placa sin tratamiento

CULTIVO BACTERIOLÓGICO POSTTRATAMIENTO.

Transcurrido este tiempo, se procedió a aplicar el fármaco intraconducto en cada diente según su grupo. El $\text{Ca}_2(\text{OH})$ se preparó en forma de lechada de Calcio 5 mg/ml (5%), disuelto en agua destilada. El grupo de Clorhexidina se utilizó su concentración del 2%, aplicando una cantidad de 0.5 ml. Para el Propóleo se usó un preparado de 0.5 ml. de Propóleo en gotas al 10% Knop®.



FIGURAS 17,18 y 19.- Hidróxido de Calcio, Clorhexidina al 2% y Propóleo 10%

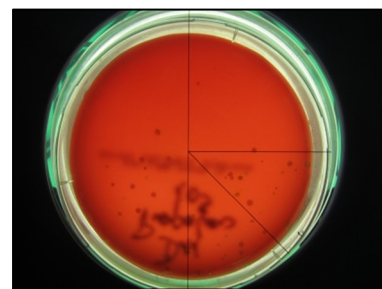
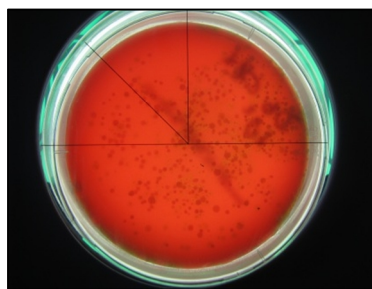
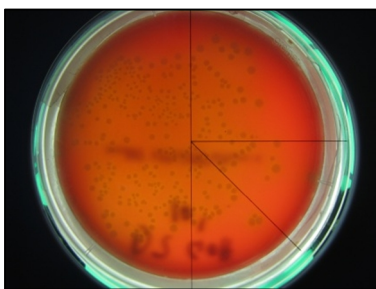
Se retiró la mota de algodón con instrumental estéril y se aplicaron los diferentes fármacos en cada diente y posteriormente sellados con una nueva mota de algodón estéril. Se llevaron a la estufa de cultivo por 24hrs. a T° constante de 37°C para la posterior obtención de las muestras (Figuras 17, 18 y 19).

El método de obtención de diluciones, siembra de placas Petri y recuento de UFC se realizó de igual forma a la descrita en los cultivos pretratamiento antes descrita.



FIGURAS 19, 20 y 21.- Medicación con Hidróxido de Calcio, Clorhexidina al 2% y Propóleo al 10%

Se tomó muestra fotográfica de cada paso y cada placa con su resultado, los cuales fueron tabulados en tabla Microsoft Excel® para posterior análisis estadístico (Figuras 22,23 y 24).



FIGURAS 22, 23 y 24.- Placas de Hidróxido de Calcio, Clorhexidina al 2% y Propóleo al 10%

IV. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos serán tabulados en el software Microsoft Excel 2010® y analizados mediante el software Stata versión 12, donde se obtendrán tablas de contingencia para ser analizadas las varianzas mediante Test ANOVA y Test de Kruskall-Wallis para comparar los grupos de estudio. Se elige este test porque permite comparar más de dos grupos, en base a muestras independientes. Se ocupará un nivel de significancia del 95%, con el fin de otorgar mayor validez al estudio.

Luego, se pasa a la prueba de comparación de los grupos de interés que serían los correspondientes a la Dilución 10^3 y 10^4 Pre y post Tratamiento, debido a que son estas diluciones en las que se pudo realizar mejor el conteo. Para esto se hacen las tablas ANOVA de comparación de medias con el estadístico F. Luego de hacer estas comparaciones podemos observar cual es el tratamiento que más difiere y así, a éste aplicarle un par de test t-student de comparación de medias y de esta manera ver si existió o no diferencia entre el Previo y post Tratamiento.

V. RESULTADOS

V.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

La siguiente tabla (Tabla II) constituye la base de datos de manera resumida donde se muestra el recuento bacteriano pre y post tratamiento, además de solo mostrar las diluciones 10^3 y 10^4 , ya que las primeras son conteos sobre los 300, por lo que se les clasifica como Incontables y no son representativos para realizar el análisis.

Hidróxido de Calcio		D 10^3 Pre	D 10^4 Pre	D 10^3 Post	D 10^4 Post
		Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC
Diente	5	203	198	0	0
	6	349	321	4	0
	9	285	256	4	2
	15	120	98	0	0
	21	295	280	0	0
	22	329	312	0	0
	24	409	400	69	45
	26	366	351	98	34
	30	294	290	0	0
	32	322	290	0	0
	34	280	251	120	60
	35	321	319	0	0
	41	571	534	158	98
	42	132	120	0	0
	43	288	256	87	15

TABLA II.- CANTIDAD DE UFC/ML PRE Y POST TRATAMIENTO EN DILUCIONES 10^3 Y 10^4 EN GRUPO TRATADO CON HIDRÓXIDO DE CALCIO

A continuación se podrá observar la Tabla III correspondiente al análisis descriptivo del grupo tratado con Hidróxido de Calcio, en el cual se puede apreciar la disminución del recuento de colonias en las dos diluciones.

Estadístico	D 10 ³ Pre	D 10 ⁴ Pre	D 10 ³ Post	D 10 ⁴ Post
Media	304,27	285,07	36,00	16,93
Máximo	571,00	534,00	158,00	98,00
Mínimo	120,00	98,00	0	0
Mediana	295,00	290,00	0	0
Moda	120,00	256,00	0	0
Rango	451,00	436,00	158,00	98,00
Error típico de la media	27,98	27,21	14,12	7,66
Suma	4.564,00	4.276,00	540,00	254,00
Varianza	11.745,35	11.102,78	2.992,14	879,50
Desviación típica	108,38	105,37	54,70	29,66

TABLA III.- ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE GRUPO TRATADO CON HIDROXIDO DE CALCIO

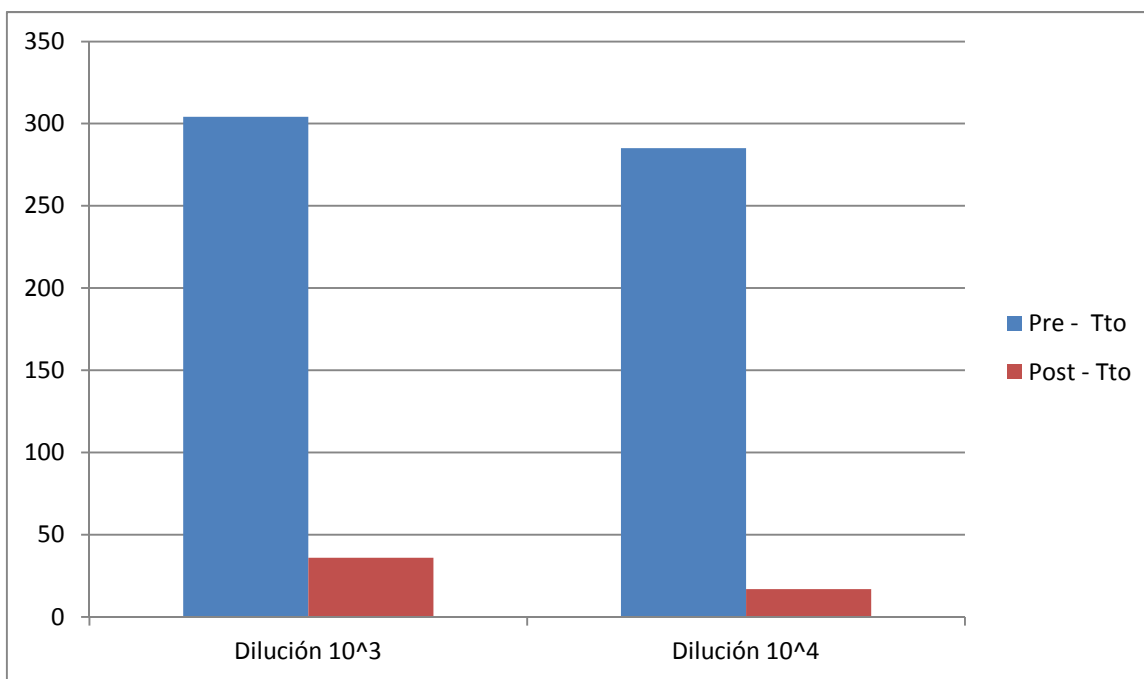


FIGURA 25.- COMPARACIÓN MEDIAS PRE Y POST TRATAMIENTO DE DILUCION 10³ Y 10⁴ EN GRUPO TRATADO CON HIDROXIDO DE CALCIO

En la Figura 25 es posible constatar la disminución del recuento de UFC/mL en las dos diluciones correspondientes al grupo tratado con Hidróxido de Calcio, por lo que se puede dilucidar que tiene efecto sobre el *E. faecalis*.

En la Tabla IV y Tabla V es posible observar los resultados correspondientes al grupo tratado con Clorhexidina.

Clorhexidina		D 10 ³ Pre	D 10 ⁴ Pre	D 10 ³ Post	D 10 ⁴ Post
		Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC
Diente	1	328	320	385	376
	2	387	345	224	132
	3	298	250	64	28
	8	432	387	56	24
	13	465	411	70	37
	14	399	344	65	27
	16	344	320	46	25
	17	478	408	35	18
	18	531	501	87	65
	25	444	420	44	20
	27	488	466	35	15
	28	455	444	28	19
	36	366	358	65	45
	40	468	455	61	38
	44	275	246	57	35

TABLA IV.- CANTIDAD DE UFC/ML PRE Y POST TRATAMIENTO EN DILUCIONES 103 Y 104 EN GRUPO TRATADO CON CLORHEXIDINA 2%

Estadístico	D 10 ³ Pre	D 10 ⁴ Pre	D 10 ³ Post	D 10 ⁴ Post
<i>Media</i>	410,53	378,33	88,13	60,27
<i>Máximo</i>	531,00	501,00	385,00	376,00
<i>Mínimo</i>	275,00	246,00	28,00	15,00
<i>Mediana</i>	432,00	387,00	61,00	28,00
<i>Moda</i>	275,00	320,00	35,00	15,00
<i>Rango</i>	256,00	255,00	357,00	361,00
<i>Error típico de la media</i>	19,50	19,54	24,33	23,77
<i>Suma</i>	6.158,00	5.675,00	1.322,00	904,00
<i>Varianza</i>	5.702,41	5.726,52	8.878,27	8.473,64
<i>Desviación típica</i>	75,51	75,67	94,22	92,05

TABLA V.- ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS GRUPO TRATADO CON CLORHEXIDINA AL 2%

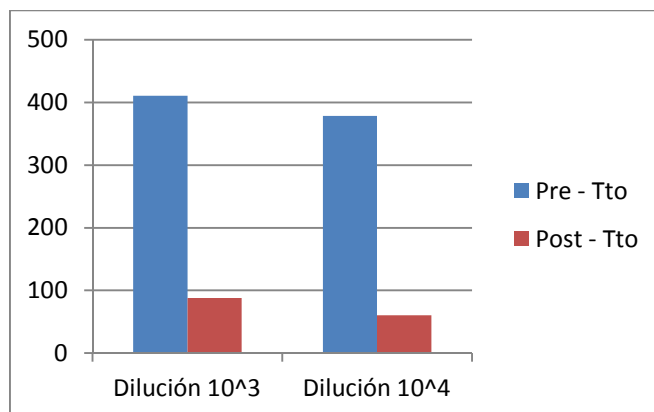


FIGURA 26.- COMPARACIÓN MEDIAS PRE Y POST TRATAMIENTO DE DILUCION 10³ Y 10⁴ EN GRUPO TRATADO CON CLORHEXIDINA AL 2%

En la Figura 26, al igual que el Hidróxido de Calcio es posible ver una disminución en el recuento bacteriano, por lo tanto, también podemos decir que hay efecto sobre el *E. faecalis*, inhibiendo su crecimiento.

Por último, en la Tabla VI y Tabla VII se mostrarán los datos correspondientes al grupo tratado con Propóleo.

Propóleo		D 10 ³ Pre	D 10 ⁴ Pre	D 10 ³ Post	D 10 ⁴ Post
		Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC
Diente	4	356	300	32	16
	7	309	298	12	8
	10	439	376	24	12
	11	364	346	50	44
	12	320	301	52	20
	19	431	399	21	7
	20	453	421	50	16
	23	502	495	18	9
	29	488	469	32	13
	31	378	341	16	0
	33	366	319	31	10
	37	434	409	12	2
	38	321	302	9	0
	39	374	341	20	12
	45	401	382	24	15

TABLA VI.- CANTIDAD DE UFC/ML PRE Y POST TRATAMIENTO EN DILUCIONES 10³ Y 10⁴ EN GRUPO TRATADO CON PROPÓLEO

Estadístico	D 10 ³ Pre	D 10 ⁴ Pre	D 10 ³ Post	D 10 ⁴ Post
Media	395,73	366,60	26,87	12,27
Máximo	502,00	495,00	52,00	44,00
Mínimo	309,00	298,00	9,00	0
Mediana	378,00	346,00	24,00	12,00
Moda	309,00	341,00	12,00	0
Rango	193,00	197,00	43,00	44,00
Error típico de la media	15,55	16,14	3,67	2,74
Suma	5.936,00	5.499,00	403,00	184,00
Varianza	3.628,07	3.908,83	201,98	112,21
Desviación típica	60,23	62,52	14,21	10,59

TABLA VII.- ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS GRUPO TRATADO CON PROPOLEO

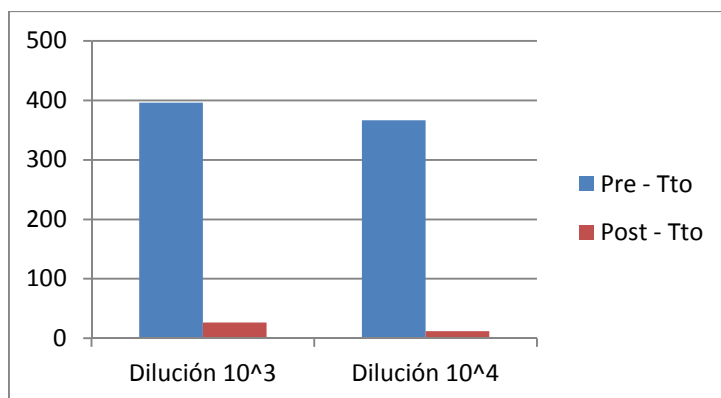


FIGURA 27.- COMPARACIÓN MEDIAS PRE Y POST TRATAMIENTO DE DILUCION 10³ Y 10⁴ EN GRUPO TRATADO CON PROPOLEO

En la Figura 27 es posible observar la disminución del recuento bacteriano, al igual que las demás soluciones.

En la Figura 28, se puede ver que todos los fármacos producen una disminución del recuento bacteriano, pero son el Hidróxido de Calcio y el Propóleo los que producen la baja más significativa.

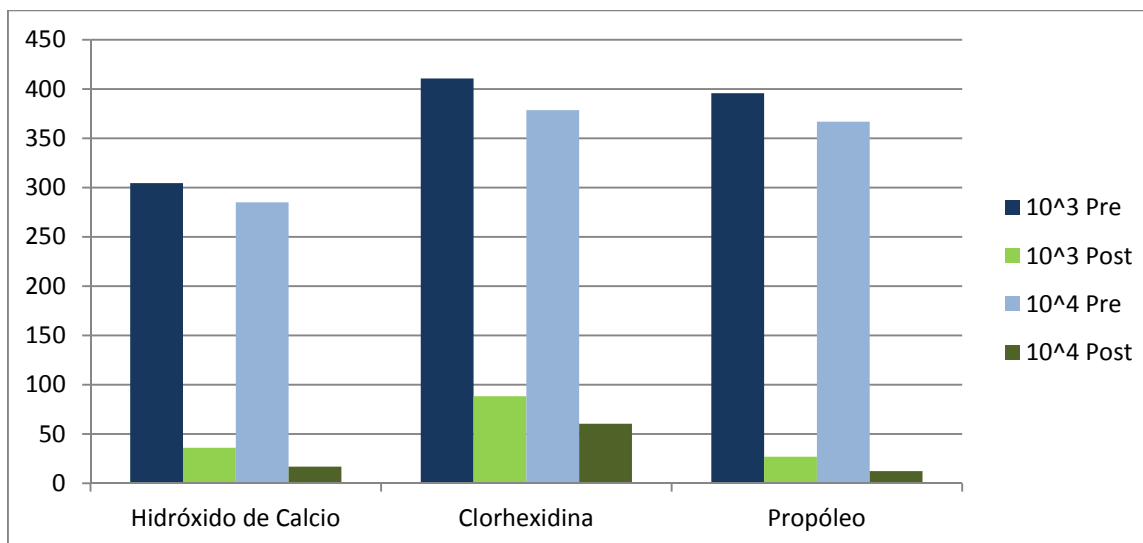


FIGURA 28.- COMPARACION RECUENTO BACTERIANO CON DILUCIONES 10³ Y 10⁴ CON LOS TRES TRATAMIENTOS (PRE Y POST TTO)

V.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El Problema a abordar es el analizar mediante un Test ANOVA un par de variables de interés que son Conteo con Dilución 10³ y Conteo con Dilución 10⁴, para 15 individuos para cada uno de los tres tratamientos, luego de hacer esto veremos cual es el tratamiento que mas difiere y a ese le realizaremos una prueba estadística t-student para ver si hay efecto en el antes y después.

La prueba ANOVA se debe aplicar bajo el cumplimiento de algunos supuestos de interés estos son:

- Variable de respuesta se distribuyen normalmente (es decir, aproximadamente una distribución normal).
- Las muestras son independientes
- Las variaciones de las poblaciones son iguales.

Como solo en el grupo de pre - tratamiento se nos cumplen, realizamos el test ANOVA.

Variable	Estadístico	GL Trat	GL Error	GL Total	Valor - P
D 103	7.07	2	42	44	0.0023
D 104	5.60	2	42	44	0.0070

TABLA VIII.- CUADRO ANOVA

La Tabla VIII muestra que si existe diferencia entre los tratamientos, porque nuestro valor-P es inferior a 0.05 (Región de rechazo), con lo que podemos deducir que el recuento bacteriano pre- tratamiento es diferente y que esta diferencia puede estar determinada por factores que se analizarán posteriormente.

Para el caso del grupo post tratamiento no se cumple la normalidad por esto se debió usar una prueba no paramétrica llamada Kruskal-Wallis. Es posible notar que por el valor P, existe diferencia en los tratamientos. Es así que se aplicó intervalos de confianza de Duncan que darán una mayor precisión de donde se presenta la diferencia (Tabla IX).

Variable	Tratamiento	Valor-P
D 10³	Hidróxido de Calcio	0.0022
	Clorhexidina	
	Propóleo	
D 10⁴	Hidróxido de Calcio	0.0004
	Clorhexidina	
	Propóleo	

TABLA IX.- INTERVALOS DE CONFIANZA DE KRUSKAL-WALLIS

Aquí notamos por el valor P que existe diferencia en los tratamientos en cuestión y también medimos con Duncan cuales difieren (Tabla X).

Variable	Contraste	Valor-P
D 10³	2 vs 1	0.030
	3 vs 1	0.695
	3 vs 2	0.015
D 10⁴	2 vs 1	0.041
	3 vs 1	0.821
	3 vs 2	0.031

TABLA X.- DUNCAN DIFERENCIA DE TRATAMIENTOS

Con la Tabla X notamos que el tratamiento que difiere es el tercero (Propóleo), por lo que se medirá mediante una prueba t-student si la diferencia entre el pre y el post del tratamiento es significativa.

Tratamiento	Variable	Estadístico t	Grados de Libertad	Valor P
Propóleo	D 10 ³	23.0598	14	~0,0000
	D 10 ⁴	21.4133	14	~0,0000

TABLA XI.- ANALISIS PRUEBA T

Con la Tabla XI corroboramos que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre antes y después de aplicar el propóleo, este ve disminuida la infección. Y se corrobora lo visto en los gráficos descriptivos de la variable.

VI. DISCUSION

Debido a la carencia de estudios existentes en los que se involucre el Propóleo como una alternativa de tratamiento, en lo que se refiere como agente antimicrobiano en el campo de la Endodoncia; es que se decidió realizar esta investigación donde se evalúa el efecto antimicrobiano de 3 fármacos en el control de uno de los principales agentes infecciosos, *Enterococcus faecalis*.

En la literatura existen diversas referencias en relación a las propiedades terapéuticas del Propóleo en general en los campos de la medicina y en odontología. He ahí nuestro interés en indagar de manera más específica el efecto antimicrobiano en el campo de la Endodoncia, en relación a la eliminación de *Enterococcus faecalis*, el cual es uno de los factores etiológicos involucrados infecciones persistentes y tratamientos endodónticos fallidos.

Para llevar a cabo este estudio se ocupó como tipo de medición la UFC/mL, el cual da una aproximación específica y cuantitativa de microbiota presente en el SCR de los dientes tratados, además se ser una forma más convencional para realizar este tipo de estudios in vitro.

Para que los resultados fueran homologables se procuró trabajar con dientes con características radiculares similares, que fueron sometidos a instrumentación para que los conductos fuesen en teoría más semejantes.

Para que el estudio tuviese importancia en el campo de Endodoncia era necesario poder ocupar un agente infeccioso emblemático, que es el *Enterococcus faecalis*, que como se mencionó anteriormente es aquel que participa junto otros microorganismos en el fracaso del tratamiento endodóntico y en las infecciones persistentes. Además se utilizó la cepa bacteriana ATCC 29212, la cual es la se encuentra específicamente en boca y por lo tanto, ocupada de manera predeterminada en el campo de la endodoncia.

El protocolo de laboratorio utilizado en la investigación coincide con el de otros estudios, constituyendo un punto a favor para validar los resultados obtenidos y por lo tanto, nuestro estudio.

Es necesario entender que nuestro estudio constituye el primero de su tipo en nuestra escuela, abriendo la línea de investigación para futuros estudios que puedan avalar los resultados obtenidos por este grupo, como aportar nuevas propiedades o aplicaciones al Propóleo en el campo de la endodoncia o en otra disciplina de la odontología.

Una vez definido cual sería el agente infeccioso a estudiar, necesitábamos elementos con los cuales probarlo. En este estudio incluimos la utilización del hidróxido de calcio como *gold standard*, ya que se trata de un agente antimicrobiano con múltiples estudios y años de aplicación clínica, y ampliamente utilizado en diversas especialidades de la Odontología por su reconocido poder antiséptico y su capacidad para estimular la reparación tisular, secundaria a su alta alcalinidad, siendo considerado eficaz contra la mayoría de los patógenos intraconductos presentes en el SCR.

Se destaca a su vez que entre sus propiedades es capaz de hidrolizar las endotoxinas bacterianas como los LPS presentes en bacterias anaerobias gram(-) y neutralizando también de esta manera, la reabsorción del tejido óseo (Soares & Goldberg, 2003).

Esto último lo podemos corroborar con los datos obtenidos en nuestro estudio en donde si se puede observar una disminución marcada en el recuento bacteriano en las diluciones 10^3 y 10^4 .

Por otra parte otros autores sostienen que el hidróxido de calcio presenta dos propiedades enzimáticas, la de inhibir enzimas bacterianas generando un efecto antimicrobiano y la de activar enzimas de los tejidos, como la fosfatasa alcalina, conduciendo al efecto mineralizador (Estrela, et al., 1995).

Se incluyó a su vez en esta investigación la CHX debido a que ha demostrado tener un amplio espectro de acción sobre microorganismos gram(+) y gram(-), hongos, anaerobios facultativos y aerobios (Bascones & Manso, 1994).

Una de sus propiedades más reconocidas es su sustentividad que le permite mantener su efecto durante un tiempo prolongado, lo que se basa en su capacidad de absorción sobre las superficies orales (Jones, 2000).

Esta última, según los resultados obtenidos no concuerdan con la mayoría de los estudios existentes, ya que los recuentos dieron elevados para la CHX, pero hay que tomar en cuenta que la cantidad de microbiota previo al tratamiento era mayor en el grupo que iba a ser tratado con este fármaco que con los otros dos. Es decir, tuvo que combatir contra muchos más patógenos, pero aun así se lograron disminuciones significativas.

También se considera que la acción de la CHX sobre los microorganismos dependerá de su concentración, la cual si es baja posee un efecto bacteriostático y en concentraciones altas un efecto bactericida. Este último es alcanzado con una concentración de CHX de 2%, donde induce una precipitación o coagulación del citoplasma celular (Yesilsoy, et al., 1995).

Por otra parte existen estudios que avalan que la solución de digluconato de clorhexidina al 2%, ejerce un efecto antimicrobiano sobre microorganismos asociados a infecciones endodónticas persistentes como el *Enterococcus faecalis* (Leonardo, 2005).

El tercer fármaco utilizado en esta investigación es aquel que deseaba comprobar como una posible nueva alternativa, el Propóleo.

El uso del Propóleo en el área Odontológica no resulta ser, en la actualidad, una práctica masiva y esto podría ser el resultado de lo mencionado en nuestro marco teórico que alude un abandono en el uso de este medicamento en pos de la arremetida de fármacos sintéticos y sus muchas investigaciones que los avalan y patrocina durante el último tiempo. Este abandono no solo fue en la praxis odontológica sino que también en el ámbito de las investigaciones que sólo resultan ser mayor en número hace algo más de 30 años.

Durante las investigaciones se comprueban las muchas propiedades que tiene este compuesto natural a nivel viral, fúngico y bacteriano en su lucha frente a estos agentes patógenos, pero son pocos los estudios que buscan corroborar la acción antimicrobiana del Propóleo específica frente a un ejemplar determinado de uno de estos microorganismos patógenos.

De aquí nace nuestra inquietud por testear en un nivel más específico al Propóleo como agente antimicrobiano frente al *Enterococcus faecalis*, quien se presenta como una de las bacterias que logra sobrevivir a las extremas condiciones propuestas por el Hidróxido de calcio en su uso en la terapia endodóntica, y que resulta responsable derechamente de los fracasos y reinfecciones en los tratamientos practicados por esta disciplina. Al mismo tiempo hay estudios en los que el uso de la Clorhexidina al 2% emula el accionar del Hidróxido de calcio, no encontrando ventajas sobre él.

El Propóleo está dotado de elementos naturales cuya composición tiene como objetivo la defensa del panal de las abejas, sus paredes, su producción mielífera, entre otras estructuras; frente a distintos agentes agresores entre los que se hayan virus, hongos y bacterias. Estas entidades juegan el mismo papel de agresores y precursores de infecciones en nuestro organismo. Siendo más específicos; son las bacterias los principales enemigos en la infecciones odontogénicas cuando sobrepasan el control ejercido por nuestro sistema inmunológico o este último se ve perjudicado en los aspectos cuantitativos y/o cualitativos.

Si bien el objetivo de este estudio no pasa por dilucidar el o los mecanismos de acción del Propóleo a la hora de probar su eficacia antimicrobiana frente al *Enterococcus faecalis*, sí podemos hacer la misma interpretación realizada por Premoli, et al., (2010) donde se menciona que es el accionar concomitante de Flavonoides, Flavonas, CAPE, Pinocembrina, Acacetina, Conferido, Galangina, Ácidos aromáticos, Ácidos grasos, Ésteres, Hidroxiácidos, Sesquiterpenos, y otros compuestos fenólicos presentes en su composición; los que se ocupan del accionar antimicrobiano del Propóleo.

Takasi et al. (1994) afirmó que el Propóleo inhibe el crecimiento bacteriano y previene la división celular. Además este extracto desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular, causando bacteriólisis parcial e inhibe la síntesis proteica (Takasi, et al., 1994), con una especial afinidad ante las bacterias grampositivas, como el *Enterococcus faecalis*.

Estos hechos pudimos corroborarlos con los resultados obtenidos a partir de la experiencia in vitro, ya que se logró comprobar que el propóleo si posee u efecto antimicrobiano contra el *Enterococcus faecalis*, y que esta disminución es estadísticamente significativa.

Es necesario recalcar que en la mayoría de los estudios utilizados para realizar el fundamento de esta investigación el Propóleo se comportaba mucho mejor que el Hidróxido de Calcio, además de tener una eficacia igual o menor a la Clorhexidina (Oncag, 2006). Pero en nuestro estudio sucedió lo contrario, teniendo una actividad igual o superior al Hidróxido de Calcio; y siendo mejor que la

Clorhexidina. Es por esto, que es necesario seguir indagando en la eficacia de este fármaco, investigándolo en conjunto con otros fármacos o someterlo a otro tipo de estudios, por ejemplo: halos inhibitorios.

En nuestro estudio el Propóleo comienza a abrirse camino como compuesto farmacológico y una alternativa natural para el odontólogo al momento de decidir cuál agente antimicrobiano usar en la terapia endodóntica.

Si bien es cierto que la experiencia avala largamente el uso tanto del Hidróxido de calcio como el de Clorhexidina, en diferentes campos de la Odontología. De aquí, será importante considerar seriamente a este nuevo agente natural como un efectivo agente antimicrobiano, de fácil manipulación y aplicación, cuyas propiedades han sido comprobadas como eficaces y de acción rápida para el control y reducción del crecimiento del *Enterococcus faecalis*, lo que implica gran importancia en el manejo de infecciones endodónticas persistentes.

A partir de estos resultados es posible pensar, que el Propóleo podría constituir una alternativa viable como medicación intraconducto. Pero, para esto falta realizar nuevos estudios que demuestren su efectividad en el tiempo, diferencias en concentración o presentación con otros agentes de medicación comúnmente usados en endodoncia.

Relacionado a este último punto parece importante indagar más en las posibles reacciones alérgicas que podrían manifestarse en pacientes que presentan hipersensibilidad a los productos producido por la abeja, lo que podría traducirse en una limitación para su uso en todos los pacientes.

No obstante, al ser considerado un producto homeopático podría condicionar una inclinación por parte de algunos pacientes para su empleo dentro de las terapias endodónticas, pudiendo alcanzar más de un ámbito disciplinario en la Odontología.

VII. CONCLUSIONES

Basados en los resultados del presente estudio que busca determinar la eficacia antimicrobiana del Hidróxido de calcio (solución), Clorhexidina 2% y el Propóleo 10% como agentes antimicrobianos frente a la cepa *Enterococcus faecalis*, podemos concluir que:

- Se demuestra que el Propóleo al 10% es eficaz al momento de inhibir el crecimiento de colonias de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC29212.
- Existe una diferencia estadísticamente significativa de una mayor eficacia del Propóleo al 10%, en comparación a la Clorhexidina 2% como agente antimicrobiano ante la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC29212.
- Se comprueba una mayor eficacia, estadísticamente significativa, por parte del Propóleo al 10% en comparación con el Hidróxido de calcio (solución) como agente antimicrobiano frente al *Enterococcus faecalis*, cepa ATCC29212.

VIII. SUGERENCIAS

El modelo in vitro utilizado en nuestro estudio, no logra emular fielmente las diferentes condiciones encontradas en la práctica clínica dentro del sistema de conductos, en los que se presentan tejidos necróticos y fluidos tisulares que reducen la actividad de las medicaciones, por lo que sería interesante realizar un caldo preparado a partir de un cultivo obtenido de un diente necrótico.

Otra condición conocida de las infecciones endodónticas es el carácter de polimicrobismo que las caracteriza, y no solo la presencia del *Enterococcus faecalis*. A partir de aquello, se producen fenómenos de agregación y coagregación bacteriana que favorecen el crecimiento y desarrollo de la microbiota.

No fue considerada la capacidad volumétrica del sistema de conductos radiculares, pudiendo ocasionarse mayor incubación de bacterias en los dientes cuyo sistema de conductos presentaban mayor volumen en comparación con los demás ejemplares. Esta limitación se intentó acotar por medio de la utilización de dientes con anatomía radicular similar y la preparación de los conductos a un diámetro estándar.

Los recursos económicos y de tiempo limitaron la extensión y profundización del estudio, ya que solo fue posible el recuento de colonias 24hrs. postratamiento, obviando el posible pick de eficacia de los distintos medicamentos; posiblemente demostrable con la realización de recuentos de CFU por cada grupo en estudio con mayor intervalos de tiempo en horas y días. Además es importante recordar que el efecto del Ca(OH)_2 es mayor a partir de los 7 días después de su aplicación.

Por último es necesario enfatizar que el accionar antimicrobiano del Propóleo al 10%, no es suficiente para eliminar en su totalidad la infección del sistema de conductos; haciéndose necesaria siempre una buena preparación biomecánica y apropiada irrigación del sistema de conductos en volumen, frecuencia e intensidad, que son indispensables para el éxito de cada terapia endodóntica.

IX. RESUMEN

El propósito de este estudio es evaluar In Vitro, la eficacia antimicrobiana de el Propóleo 10mg/ml frente al *Enterococcus faecalis*, y compararla con la del Hidróxido de Calcio 5mg/ml y Clorhexidina al 2%.

Se realizará sobre una muestra de 45 dientes uniradiculares extraídos, con conductos aparentemente rectos, esterilizados e inoculados con la cepa ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. Se incubarán por 24 horas, para realizar un recuento de UFC. Luego, serán distribuidos aleatoriamente en tres grupos, a cada cual se le inoculará con uno de los agentes en estudio, para incubarlos por 24 horas y realizar recuento de UFC. Los datos obtenidos serán analizados mediante el test Anova. Los resultados obtenidos confirman que el Propóleo al 10% es un efectivo agente antimicrobiano frente a *Enterococcus faecalis* (P- Valor ~0,0000), al igual que el Hidróxido de Calcio 5mg/ml y la Clorhexidina al 2%.

Por lo tanto, es posible realizarmás pruebas con el Propóleo para confirmar su posible uso como agente de medicación o irrigante dentro de la terapia endodóntica, de modo que se constituya como una nueva alternativa dentro de la gama de fármacos que se pueden utilizar en Endodoncia.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, T., 2004. [En línea] Available at: <http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinivitadoold/odontoivitado41.htm>
[Último acceso: Enero 2012].

Bankova, V., 2005. Chemical Diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, Volumen 100, pp. 114-117.

Bascones, A. & Manso, F., 1994. Clorhexidina en Odontomatología: Conceptos actuales y revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología*, Volumen 10, pp. 685-708.

Cizmarik, J. & Trupl, J., 1976. Effects of propolis on bacteria. *Pharimazie*, 31(9), pp. 656-657.

Cohen, S. & Burns, R. C., 2004. Estructura y funciones del complejo dentinopulpar. En: *Vías de la Pulpa*. Octava ed. Madrid: Mosby.

de Andrade, F. B. F., Aparecido, S. T., Maniglia, C. F. & Marcucci, M. C., 2007. Antimicrobial effects of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *O. Surg O. Med O. Pathol O. Radiol Endod*, 104(5), pp. 709-714.

De la Maza, F. J. & Torres, J., 2006. Evaluación de la Eficacia Antimicrobiana del Hidróxido de Calcio en cuatro diferentes vehículos frente al *Enterococcus Faecalis*.

De la Maza, L. M., Pezzlo, M. T. & Shigei, J. T., 2004. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Delany, G., Patterson, S., Miller, C. & Newton, C., 1982. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg*, 53(5), pp. 518-523.

Doodstar, S., Burke, M. & Mayer, R., 2000. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochromes p450 and CYPB1. *Toxicology*, Volumen 144, pp. 31-38.

Duarte, S. y otros, 2003. Effects of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of human streptococci. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Volumen 26, pp. 527-531.

Estrela, C., Sydney, G., Brammann, L. & Felipe, J. O., 1995. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.*

Evans, M., Davies, J., Sundvist, G. & Fidgor, D., 2002. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus Faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.*

Fardal, O. & Turmbull, R., 1986. A review of the literature on the use of chlorhexidine in dentistry. *JADA*, Volumen 112, p. 863–869.

Fernandez, S. y otros, 2004. Direct and airborne contact dermatitis from propolis beekeepers. *Contact Dermatitis*, Volumen 50, pp. 3320-321.

Ferraz, C. e. a., 2001. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant.. *J.Endod*, 27(7), pp. 452-455.

Flórez, J., Armijo, J. A. & Mediavilla, A., 1997. Antisépticos generales y locales. En: *Farmacología Humana*. Tercera ed. Barcelona: Masson S.A, pp. 1213-1219.

Gebara, E., Lima, L. & Mayer, M., 2002. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4).

Hegazi, A. G., 1997. Propolis an overview. pp. 1-12.

Iorich, N., Derevici, A. & Petrescu, A., 1965. Virulicidal action in vitro of alcoholic extracts of drone larvae and propolis.. *Lucr. stint. stat. Cent.Seri. Apic*, Volumen 5, pp. 107-110.

Jones, 2000. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periontology*, Volumen 15, pp. 55-62.

Kayaoglu, G. & Orstavik, D., 2004. Virulence Factors of *Enterococcus Faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 5(15), pp. 308-320.

Korzen, B., Krakow, A. & Green, D., 1974. Pulpal and periapical tissue responses in conventional and monoinfected gnotobiotic rats.. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 37(5), pp. 783-802.

Leonardo, M. R., 2005. Preparación Biomecánica de los Conductos Radiculares. Definición y Conceptualización, Finalidad, Importancia. Recursos Convencionales para su Aplicación: Medios Químicos (Soluciones Irrigantes); Medios Físicos (Irrigación, Aspiración e Inundación). En: *Endodoncia, Tratamiento de Conductos Radiculares, Principios Técnicos y Biológicos*. Sao Pablo, Brasil: Artes Médicas Latinoamérica, pp. 435-480.

- Leonardo, M. R., 2005. Preparación Biomecánica de los Conductos Radiculares. Definición y Conceptualización, Finalidad, Importancia. Recursos Convencionales para su Aplicación: Medios Químicos (Soluciones Irrigantes); Medios Físicos (Irrigación, Aspiración e Inundación) . En: *Endodoncia, Tratamiento de Conductos Radiculares, Principios Técnicos y Biológicos*. Sao Pablo, Brasil: Artes Médicas Latinoamérica, p. 435.
- Liébana, J., 2002. En: *Microbiología Oral*. Segunda ed. México: McGraw Hill, pp. 597-605.
- Lindhe, T., Karting, N. & Lang, 2000. Antisépticos para el tratamiento dental. En: *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Madrid: Médica Panamericana S.A., pp. 473-492.
- Love, R., 2001. Enterococcus faecalis mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.*
- Marcucci, M. C., 1995. Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Volumen 26, pp. 83-99.
- Milena, L., Leifertova, I. & Boloun, I., 1989. Fungistatic effect of propolis. *Folia pharm Univ. Carol*, Volumen 13, pp. 29-44.
- Murray, B., 1998. Diversity among the multidrug-resistant enterococci. *Emerging Diseases*, 4(1), pp. 46-65.
- Nerwich, A., Figdor, D. & Messer, H., 1993. pH changes in root dentine over a week period following root conducto dressing with calcium hydroxide. *Int Endod J.*
- Oncag, O., 2006. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against enterococcus faecalis. *General Dentistry*, 54(5), pp. 319-322.
- Pérez Vallejo, M. M. y otros, 2006. *actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcoólico de propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica*. Viña del Mar: s.n.
- Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. & Bankova, V., 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition.. *Phytomedicine.*, 12(3), pp. 221-228.
- Portenier, I., Waltimo, T., Orstavik, D. & Haapasalo, M., 2005. The susceptibility of starved, stacionary phase and growing cells of enterococcus faecalis to endodontic medicaments. *Journal of Endodontics*, 31(5), pp. 380-386.

Premoli, G. y otros, 2010. Uso del propóleo en odontología. *Acta Odontológica venezolana*, 48(2), pp. 3-8.

Rôcas, I., Siqueira, J. & Santos, K., 2004. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*, Issue 30, pp. 315-320.

Rodríguez, G., 2002. Streptococcus y Enterococcus. En: *Temas de bacteriología y Virología Médica*. s.l.:s.n., pp. 273-290.

Silva, C., 1999. Efetividade antimicrobiana de hipoclorito de sódio e clorhexidina como irrigantes endodónticos..

Siqueira, J. y otros, 1997. Evaluation of the effectiveness pf Sodium Hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canals. *International Endodontic Journal*, Volumen 30, pp. 279-282.

Soares, I. J. & Goldberg, F., 2003. Procedimientos químicos auxiliares de la preparación quirúrgica. En: *Endodoncia técnicas y Fundamentos*. Madrid, España: Medica Panamericana, pp. 127-140.

Stock, C., Kishor, G., Goodman, J. R. & Walker, R. T., 1996. Medicación intraductal y obturación temporal. En: *Atlas en color y texto de endodoncia*. Segunda edicion ed. Madrid - España: Harcourt Brace, pp. 145-150.

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J. & Owatz, C. B., 2006. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment. *Journal of Endodontics*, Issue 32, pp. 96-98.

Takasi, Kinkuni, N. & Schilir, H., 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigation of the possible mecamism of the antibacterial action of propolis. *Povenance planta Med.*, 60(3), pp. 222-227.

Ten Cate, A., 1998. *Oral histology development, structure and function*. 5ta ed. San Luis: Mosby.

Torabinejad, M. & Walton, R., 2002. Endodoncia: Principios y Práctica. En: s.l.:s.n., pp. 38-48.

Victorino, F. R. y otros, 2010. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *Journal Appl. Oral science*, 18(6), pp. 621-624.

Vuida-Martos., M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. & Pérez-Alvarez, J., 2008. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *Journal of food science*, 73(9), pp. 117-121.

Walton, R. & Torabinejad, M., 1997. Anatomía Interna. En: *Endodoncia Principios y Práctica*. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana, pp. 216-229.

Yesilsoy, C. y otros, 1995. Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 21(10), pp. 513-515.

XI. ANEXOS

XI.1 CARTA SOLICITUD DE RECURSOS MATERIALES PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. CORMUVAL

VALPARAÍSO, 19 DE MARZO DE 2012.

A : DIRECTOR DE CORMUVAL

DE : FELIPE PEREIRA FIGUEROA, RODRIGO PEREZ GOLDBERG, OSKAR PIERINGER BAEZA, ALUMNOS DE QUINTO AÑO DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO.

Sr. Director de CORMUVAL:

A través de la presente nos dirigimos a Ud. Con el fin de saludarle y solicitar su autorización para llevar a cabo nuestro proyecto de seminario de título. Este es de carácter experimental in vitro en el que se tiene proyectado el uso de dientes extraídos de pacientes que han concurrido a los consultorios pertenecientes a la corporación municipal Valparaíso

Esperando su acogida, se despiden Atte.

XI.2 CARTA SOLICITUD DE RECURSOS MATERIALES PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. CORMUVIÑA

VALPARAÍSO, 19 DE MARZO DE 2012.

A : DIRECTOR CORPORACIÓN MUNICIPAL VIÑA DEL MAR

DE : FELIPE PEREIRA FIGUEROA, RODRIGO PEREZ GOLDBERG, OSKAR PIERINGER BAEZA, ALUMNOS DE QUINTO AÑO DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO.

Sr. Director de Corporación Municipal Viña del Mar:

A través de la presente nos dirigimos a Ud. Con el fin de saludarle y solicitar su autorización para llevar a cabo nuestro proyecto de seminario de título. Este es de carácter experimental in vitro en el que se tiene proyectado el uso de dientes extraídos de pacientes que han concurrido a los consultorios pertenecientes a la corporación municipal Viña del Mar.

Esperando su acogida, se despiden Atte.