

**ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL MTA MEZCLADO
CON HIPOCLORITO DE SODIO Y CLORHEXIDINA EN CONTACTO CON
*Enterococcus faecalis***

AUTORES

JAVIER ALVEAR PEREZ

LUZMIRA BAEZA VALDELAMAR

LILIANA RODRIGUEZ BALLESTEROS

POSTGRADO DE ENDODONCIA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

2012

**ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL MTA MEZCLADO
CON HIPOCLORITO DE SODIO Y CLORHEXIDINA EN CONTACTO CON
*Enterococcus faecalis***

INVESTIGADORES

JAVIER ALVEAR PEREZ

**Endodoncista - Universidad Javeriana
Profesor Titular Universidad de Cartagena**

COINVESTIGADORES

**LUZMIRA BAEZA VALDELAMAR
LILIANA RODRIGUEZ BALLESTEROS
Residentes Postgrado de Endodoncia**

ASESOR METODOLOGICO

**FARID DAMIAN GONZALEZ MARTINEZ
Magister en Salud Pública Universidad Nacional de Colombia
Docente Facultad de Odontología Universidad de Cartagena**

**POSTGRADO DE ENDODONCIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

2012

PAGINA DE ACEPTACIÓN

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL EVALUADOR

PAGINA DE DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está enteramente dedicado al **DIOS TODOPODEROSO** que nos esforzó y acompañó cada día para sacar nuestra especialización adelante.

A nuestros padres, esposos, hijos y demás familiares, porque creyeron en nosotras, dándonos su ayuda y apoyo, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy podemos ver alcanzada nuestra meta, ya que siempre estuvieron impulsándonos en los momentos más difíciles de la especialización, y porque el orgullo que sienten por nosotras, fue lo que nos hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiramos su fortaleza y por lo que han hecho de nosotras.

A nuestros docentes, auxiliares, colaboradores, pacientes y amigos.

Gracias por haber fomentado en nosotras el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Nuestras palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, esperamos contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO

Infinitas gracias a Dios Todopoderoso por habernos dado la sabiduría y el entendimiento para poder llegar al final de nuestra carrera, por proveernos de todo lo necesario para salir adelante y por todo lo que nos ha dado.

A NUESTROS PADRES

Mil gracias por el apoyo incondicional que nos brindaron por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de nuestra carrera, así como su comprensión y paciencia en momentos difíciles que tuvimos.

A NUESTRAS FAMILIAS

Esposos e hijos ya que estuvieron apoyándonos incondicionalmente a lo largo de nuestra carrera dándonos fuerzas para seguir adelante.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	15
2. MARCO TEORICO	22
2.1 <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> Y SU PARTICIPACIÓN EN LAS INFECCIONES DE ORIGEN ENDODÓNTICO	22
2.1.1 Características generales de los <i>Enterococcus</i> .	23
2.1.2 Características microbiológicas del <i>Enterococcus Faecalis</i> .	24
2.1.3 Métodos de detección de <i>Enterococcus faecalis</i> .	27
2.1.3.1 Cultivo y Observación Microscópica.	28
2.1.3.2 Métodos moleculares.	30
2.1.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	31
2.1.3.4 Transcriptasa reversa PCR.	32
2.1.4 Incidencia de <i>Enterococcus faecalis</i> en las infecciones endodónticas.	34
2.1.4.1 Control microbiológico de <i>Enterococcus Faecalis</i> .	35
2.1.4.2 Control microbiológico con medicación local	35
2.1.4.2.1 Irrigantes.	35
2.1.4.2.2 Hipoclorito de sodio.	36
2.1.4.2.3 Digluconato de Clorhexidina.	40
2.1.5 Efecto antimicrobiano del gluconato de clorhexidina contra hipoclorito.	45
2.1.5.1 Control microbiológico con materiales de obturación.	48
3. OBJETIVOS	64
3.1 OBJETIVO GENERAL	64
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64

4. METODOLOGÍA	65
4.1 TIPO DE ESTUDIO	65
4.2 MUESTRA	65
4.3 VARIABLES	65
4.4. PROCEDIMIENTO	66
4.4.1 Grupos experimentales o tratamientos.	66
4.4.2 Estandarización del método.	66
4.4.3 Prueba experimental.	67
4.4.4. Análisis estadístico.	67
5. RESULTADOS	68
6. DISCUSIÓN	71
7. CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resumen promedios halos de inhibición cepa de laboratorio ATCC 29212	68
Tabla 2. Análisis estadístico comparativo de los tratamientos en la cepa de laboratorio ATCC29212	69
Tabla 3. Resumen halos de inhibición de cepas clínicas	69
Tabla 4. Análisis estadístico comparativo de los tratamientos en las cepas Clínicas	70
Tabla 5. Tabla de Análisis Estadístico	70

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el presente estudio	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. IMAGEN DE PLATOS DE CULTIVO

Anexo 2. IMAGEN DE MEDICIÓN DE PLATOS DE CULTIVO

Anexo 3. IMAGEN DE APLICACIÓN DEL MTA EN PLATOS DE CULTIVO

Anexo 4. INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Anexo 5. INSTRUCTIVO

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la efectividad antimicrobiana de la mezcla del MTA con Hipoclorito de sodio y Clorhexidina en contacto con el *Enterococcus faecalis*.

Métodos: Los materiales empleados MTA (Dentsply, Tulsa dental, OK, USA), Hipoclorito de sodio (NaOCL) y Clorhexidina (CHX); los cuales fueron estrictamente manipulados según las instrucciones del fabricante. La actividad antimicrobiana de las dos sustancias en diferentes concentraciones fue evaluada por método de difusión en Agar contra una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y 8 cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* y *spp*. Para la evaluación de los diferentes tratamientos se utilizó un instrumento y los datos fueron analizados por la prueba ANOVA.

Resultados: La efectividad antimicrobiana del tratamiento de MTA con CHX al 2% mostró el mayor diámetro de halo de inhibición. Los factores que determinaron este resultado fueron: la difusión del medio, la sustantividad de la CHX y a la asociación de la CHX con un medio físico.

Conclusiones: La efectividad antimicrobiana del tratamiento de MTA con CHX al 2% se puede explicar por estos tres factores asociados; sin embargo, el tratamiento de MTA con NaOCL al 5.25% obtuvo resultados muy cercanos.

Palabras Claves: Hipoclorito de sodio, clorhexidina, actividad antimicrobiana, mineral trióxido agregado.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antimicrobial effect of MTA mixture with sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*.

Methods: The materials used MTA (Dentsply, Tulsa Dental, OK, USA), sodium hypochlorite (NaOCl) and chlorhexidine (CHX), which were handled strictly according to the manufacturer's instructions. The antimicrobial activity of the two substances in different concentrations was evaluated by agar diffusion method against a strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and eight clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *spp.* For the evaluation of different treatments used an instrument and data were analyzed by ANOVA test.

Results: The antimicrobial effectiveness of treatment with CHX MTA 2% showed the highest inhibition zone diameter. Important factors in this result were: the diffusion of the medium, the substantivity of CHX and CHX association with physical media

Conclusions: The antimicrobial effectiveness of treatment with MTA 2% CHX can be explained by three factors associated, however, the MTA with NaOCl treatment of 5.25% obtained results very close.

Key words: sodium hypochlorite, chlorhexidine, antimicrobial activity, mineral trioxide aggregate (source: MeSH, NLM)

INTRODUCCIÓN

El Mineral Trióxido Agregado (MTA) es un cemento de uso endodóntico empleado para obturar las vías de comunicación entre la cámara pulpar, el sistema de conductos radiculares y el espacio perirradicular; incluyendo las obturaciones apicales retrogradas. El MTA es un material compuesto por diversos óxidos minerales, donde el Calcio es el principal ion. El material consiste en un polvo de partículas finas hidrofílicas que al hidratarse forman un gel coloidal que fragua y se transforma en una estructura sólida.

El material ideal para obturación en endodoncia debe proporcionar un adecuado selle apical debido a que los microorganismos juegan un papel muy importante en el desarrollo de las enfermedades pulpar y periapical, así como en los fracasos endodónticos. Entre otras propiedades del material ideal de obturación están la de ser dimensionalmente estable, radiopaco, no tóxico, no reabsorbible y no producir daño en los tejidos periapicales. Adicionalmente, el material de obturación podría ser bactericida. El Mineral Trióxido Agregado (MTA) cumple con varias de estas propiedades.

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación de los microorganismos asociados a los tejidos infectados así como también de un selle adecuado del foramen apical para prevenir una futura reinfección.

Se conocen varios microorganismos que repetidamente se encuentran relacionados con los fracasos endodónticos y que cubren la porción apical de un diente obturado que previamente había sido infectado. Entre estos los principales son los *Enterococcus*. El *Enterococcus faecalis* se encuentra en una alta proporción en dientes con fracaso endodóntico.

Por lo tanto, se justifica realizar un estudio en el cual se logre alcanzar la propiedad bactericida del material obturador de uso endodóntico para evitar que nuevamente sea re infectado el canal y los tejidos periapicales. Para lograr este objetivo se propone la mezcla del MTA, que es un material de uso endodóntico que reúne varias propiedades del material obturador ideal, con sustancias irrigadoras de uso clínico de comprobada eficacia antimicrobiana y así obtener un material obturador con mejores propiedades y resultados clínicos efectivos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El material ideal de obturación debe proporcionar un adecuado sellado apical, debe ser estable dimensionalmente, ser radiopaco, no reabsorbible, no tóxico y ser tolerado por los tejidos periapicales. Además debería ser bactericida o bacteriostático. Algunos estudios han demostrado el potencial antimicrobiano del MTA. Esa actividad se evidencia por el elevado pH alcalino y por la concentración de iones hidroxilo.

Así, encontramos de interés para este estudio, medir la eficacia antimicrobiana del MTA al mezclarlo con sustancias antimicrobianas de uso clínico frecuente como Hipoclorito y Clorhexidina en contacto con bacterias de las lesiones apicales como el *Enterococcus faecalis* para potencializar su efecto antimicrobiano como material de obturación radicular y de esta forma obtener mayor éxito en el tratamiento endodóntico.

En la literatura encontramos investigaciones similares Baumgartner y Falkler en 1991 investigaron la flora bacteriana de los últimos 5 mm apicales de conductos radiculares infectados. Encontrando que el 68% de las bacterias asociadas con lesiones periapicales eran anaerobias estrictas.

Hong y colaboradores compararon el efecto antimicrobiano de la amalgama, SuperEBA® y MTA (Loma Linda University, Loma Linda CA) sobre 5 bacterias anaerobias facultativas: *Lactobacillus sp*, *Streptococcus faecalis* (actualmente reclasificado como *Eenterococcus faecalis*), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius*.

Los resultados mostraron que el MTA tiene un menor efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus faecalis* y posee un mayor efecto sobre las 4 bacterias restantes. El SuperEBA® fresco no mostró efecto antibacteriano sobre el *Lactobacillus sp*, *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus mutans*; pero tuvo un ligero efecto sobre el *Streptococcus mitis* y el *Streptococcus salivarius*. Mientras que la amalgama no mostró efecto antibacteriano sobre ninguno de los microorganismos estudiados.

Torabinejad sobre la base del trabajo realizado por Baumgartner y Falkler en 1991; llevó a cabo un estudio donde tomó las muestras de las especies bacterianas encontradas en ese estudio, y compararon el efecto antimicrobiano de la amalgama, del óxido de zinc-eugenol, del SuperEBA® y del MTA (Loma Linda University, Loma Linda CA). El objetivo del mismo era evaluar la capacidad de los materiales de obturación del extremo apical en prevenir el crecimiento bacteriano de 9 bacterias anaerobias facultativas:

Enterococcus faecalis, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus species*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Además, evaluaron 7 bacterias anaerobias estrictas: *Prevotella buccae*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogénica*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* y *Peptostreptococcus anaerobius*.

Los resultados indicaron que ninguno de los materiales estudiados demostraron actividad antimicrobiana sobre los microorganismos anaerobios estrictos. Cuando fue evaluado el MTA, se observó que tuvo efecto antimicrobiano, en 5 de los 9 tipos de bacterias anaerobias facultativas evaluadas. Este efecto antibacteriano es atribuible a su alto pH luego de gelificar, o a la liberación de sustancias en el medio de crecimiento bacteriano.

Por consiguiente, Estrela determinaron la acción antimicrobiana del ProRoot® MTA gris (Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa, OK.), PC (Cia. Portland Cement Itaú, Itaú de Minas, MG, Brazil), Hidróxido de calcio en pasta (CHP, P.A., Quimis, Mallinkrodt Inc., St. Louis, MO, USA + saline solution), Sealapex® (Sybron-Kerr, Romulus, MI, USA) y Dycal® (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil). Emplearon 4 cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, Fueron inoculadas 30 placas de Petri con 20 ml del agar infusión cerebro corazón (BHI) en 0,1 ml de la suspensión experimental. Se realizaron 3 cavidades, cada una con 4 mm de profundidad y 4 mm de diámetro en cada placa, posteriormente fueron rellenos con los materiales a prueba. Las placas fueron pre-incubadas por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas.

Los resultados demostraron que la actividad antimicrobiana del CPH fue superior al ProRoot® MTA, PC, Sealapex® y Dycal®, para todos los microorganismos estudiados. El CPH mostró zonas de inhibición que van desde 6 a 9.5 mm y los rangos de difusión van desde 10 a 18 mm. El MTA, PC, y Sealapex® mostraron las zonas de inhibición dentro de este rango, donde éste último produjo la mayor zona. El MTA y el PC mostraron zonas de inhibición contra el *S. aureus*, y *P. aeruginosa* entre 7 y 8 mm respectivamente, y la inhibición del *B. subtilis* y *C. albicans* fueron similares para estos materiales. El PC mostró la difusión de una zona de 16 mm y el MTA de 14 mm contra el *E. faecalis* respectivamente. El Dycal® no mostró ninguna zona de inhibición microbiana.

No obstante, Quintana en un estudio preliminar del PC ordinario, determinó el crecimiento bacteriano y el pH de este material. El estableció que este cemento no favorece el crecimiento bacteriano, lo que se explica por su alta alcalinidad (pH de 10), por lo que no provee las condiciones óptimas para la proliferación bacteriana. El *Enterococcus faecalis* desempeña un papel importante en la etiología de las lesiones perirradiculares persistentes. Está asociado al fracaso endodóntico entre

un 24% y 77%. Dicho microorganismo, posee varios factores de virulencia que contribuyen a su capacidad para sobrevivir a los efectos de la terapia endodóntica convencional. Es por ello, que diversos investigadores se han abocado en estudiar el efecto antibacteriano del MTA sobre dicho microorganismo.

Por otra parte, otro estudio realizado por Stowe y colaboradores evaluaron las propiedades antimicrobianas del ProRoot® MTA blanco (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) encontrando que éste inhibía el crecimiento del *Enterococcus faecalis* y el *Streptococcus sanguis*, y al mezclar el MTA con CHX al 0,12% en lugar de agua estéril, aumentaba su acción antibacteriana. Asimismo, trabajos publicados por otros investigadores han mostrado que el MTA retarda o impide el crecimiento del *Enterococcus faecalis*, teniendo una mayor actividad antibacteriana que otros materiales.

En virtud de la diversidad de resultados reportados en los diferentes estudios, Al-Hezaimi y colaboradores compararon el efecto antibacteriano del ProRoot® MTA blanco y gris (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) a diferentes concentraciones sobre el *Enterococcus faecalis* y el *Streptococcus sanguis*. Ambos tipos de MTA fueron preparados en concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 y 1,56 mg/ml de la dilución en agua destilada. Cada muestra fue llevada a un tubo que contenía el agar Sabouraud. Se inocularon los microorganismos, los grupos fueron incubados a 37°C y se evaluó la turbidez del medio a las 0, 1, 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Los resultados indicaron que existe una correlación directa entre la concentración del MTA, ya sea de color gris o blanco, y su efecto antibacteriano sobre la cepa de los microorganismos estudiados. Los controles negativos no mostraron crecimiento bacteriano en cualquier período de tiempo, mientras que los controles positivos si mostraron crecimiento bacteriano, existiendo diferencias significativas entre ambos controles. En el período de tiempo cero, las muestras tanto del MTA

gris como el blanco mostraron crecimiento bacteriano independientemente de la concentración y de los microorganismos.

En los grupos del *E. faecalis*, los tubos que contenían el MTA gris en concentraciones de 50, 25, y 12,5 mg/ml no mostraron crecimiento bacteriano en todos los períodos de tiempo. Los tubos que contenían MTA blanco, mostraron crecimiento bacteriano en todas las concentraciones y períodos de tiempo. Igualmente, no se observaron diferencias significativas entre el MTA blanco y gris en concentraciones más bajas.

En los grupos del *E. sanguis*, los tubos que contenían el MTA gris en las concentraciones de 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 mg/ml no mostraron crecimiento bacteriano en todos los períodos de tiempo. La concentración de 1,56 mg/ml de MTA gris mostró crecimiento bacteriano en todos los períodos de tiempo. Los tubos que contenían el MTA blanco en concentraciones de 50, 25 y 12,5 mg/ml no mostraron crecimiento bacteriano en todos los intervalos de tiempo. No se observaron diferencias significativas entre el MTA blanco y gris en cualquiera de las otras concentraciones.

En virtud de las condiciones de este estudio, los autores afirman que la susceptibilidad del *E. faecalis* y el *S. sanguis* difiere con el MTA. El MTA gris requiere de concentraciones más bajas que el MTA blanco para ejercer el mismo efecto antibacteriano independientemente del microorganismo.

Igualmente, Holt y colaboradores realizaron un estudio in Vitro para comparar el efecto antimicrobiano del ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) en sus 2 presentaciones blanco y gris, sobre el *Enterococcus faecalis* cuando es mezclado con agua estéril o CHX al 2%. La prueba fue realizada mediante la colocación del MTA recién mezclado en placas de agar inoculadas con el

Enterococcus faecalis y se compararon las zonas de inhibición a las 24 horas. Posteriormente, los valores fueron registrados y comparados.

Los resultados mostraron que las zonas de inhibición fueron significativamente mayores para las muestras mezcladas con CHX al 2%. El MTA gris presentó mayores zonas de inhibición bacteriana que el MTA blanco.

Por otro lado, Giardino y colaboradores realizaron un estudio en donde compararon la eficacia de los antimicrobianos NaOCl 5,25%, Biopure MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN), y Ogná Tetraclean (Laboratorio Farmaceutici, Milano, Italia) contra *Enterococcus faecalis*. Después de la incubación, la membrana de los filtros se transfirieron a tubos con 5 ml de la seleccionado la solución de agente antimicrobiano prueba o NaOCl al 0,9% (control positivo) y se incubó durante 5, 30 y 60 minutos a 20 ° C. Después de cada periodo de tiempo, la prueba agentes se agitó durante 60 segundos para volver a suspender los microorganismos. Diluciones seriadas Diez veces se han generado en el líquido se reduzca el transporte. Cada dilución se llevó en una infusión de las placas del cerebro al corazón. Las placas fueron incubadas durante 48 horas en una atmósfera aerobia a 37° C y las unidades formadoras de colonias por membrana se calcularon. El análisis estadístico mostró que sólo 5.25% NaOCl puede disgregar y eliminar el biofilm.

Kogan y colaboradores realizaron un estudio con el propósito de identificar los tipos y cantidades de aditivos que se mezclan con el MTA para mejorar sus propiedades de ajuste. Los aditivos probados incluyeron la solución salina, lidocaína al 2%, 3.0% NaOCl gel, gel de gluconato de Clorhexidina, KY Jelly, 3% y 5% de CaCl₂. Los tiempos de fraguado se evaluaron utilizando un aparato de Vicat, resistencia a la compresión del conjunto materiales fueron evaluados con una máquina Instron. Los resultados obtenidos fueron que Gel de NaOCl, K-Y Jalea y 5% de CaCl₂ redujo el ajuste de tiempo de 20 a 25 minutos; resistencia a

la compresión de estos materiales establecidos fueron considerablemente inferiores a MTA mezclado con agua ($p < 0.05$). Debido a que la MTA se mezcla con Gel de NaOCl demostrado buenas propiedades de trabajo y tiempo de fraguado mejorado, esta combinación puede ser una opción viable opción en los procedimientos de visita única, donde la compresión resistencia del material no es un tema crítico.

Aunque las anteriores investigaciones han tenido resultados positivos en la efectividad del MTA mezclado con Clorhexidina e Hipoclorito no se ha descrito cual de las mezclas de uso frecuente en la clínica es la que tiene mayor efecto antimicrobiano y no altera ninguna de las propiedades del MTA, en particular su pH, manteniendo intactas sus propiedades para favorecer la reparación de las lesiones periapicales.

La importancia de esta investigación es aportar solución a uno de los problemas más frecuentes en el campo de la endodoncia como es el de la eliminar los microorganismos de la zona apical mediante la mezcla del MTA con sustancias antimicrobianas de uso frecuente en la clínica en contacto con el *enterococcus faecalis* para potencializar el efecto antimicrobiano del MTA y obtener mayor éxito en el tratamiento endodóntico.

Ante esta situación surge la necesidad de implementar procedimientos que favorezcan la disminución y eliminación de los microorganismos y ayuden a la reparación de lesiones periapicales a través de la utilización de sustancias de uso clínico que potencialicen o favorezcan el efecto antimicrobiano del MTA y así favorecer la reparación.

¿Cuál es la efectividad antimicrobiana producida sobre el *enterococcus faecalis* al estar en contacto con el MTA mezclado con NaOCl y Clorhexidina?

2. MARCO TEORICO

2.1 *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y SU PARTICIPACIÓN EN LAS INFECCIONES DE ORIGEN ENDODÓNTICO

La literatura endodóntica ha establecido claramente la participación de los microorganismos y sus productos en el desarrollo de la periodontitis apical. La periodontitis apical persistente se origina cuando la terapia endodóntica per se no elimina adecuadamente la infección intrarradicular¹.

Tal es el caso de *Enterococcus Faecalis*, microorganismo preponderante en las infecciones endodónticas persistentes, el cual gracias a sus características fenotípicas y microbiológicas particulares es capaz de sobrevivir en medios ambientes áridos con poca cantidad de oxígeno y nutrientes, así como también es capaz de formar biopelículas entre microorganismos de su misma especie o con otros microorganismos y de sobrevivir frente a protocolos de irrigación, medicaciones intraconducto y materiales de obturación².

Por todas estas características presentes en el *Enterococcus faecalis* y por la necesidad de cumplir con el objetivo biológico principal de la terapia endodóntica, es decir, la eliminación de la infección o la prevención de la misma, es importante conocer la acción de cada medicamento intraconducto, irrigante o material de obturación sobre este microorganismo³.

¹ CHU FC, LEUNG WK, TSANG PC, CHOW TW, SAMARANAYAKE LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. En: J Endod. Enero 2006.vol 32, N°1, p 17-23.

² KAYA OGLU G, ORSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. En: Crit Rev Oral Biol Med. Septiembre 2004. Vol 15, N°5 , p 308-20.

³ Ibid., p 308-20.

2.1.1 Características generales de los *Enterococcus*. Los *Enterococcus* son microorganismos que forman parte de la flora normal en la cavidad bucal y el tracto gastrointestinal y han sido reconocidos como potenciales patógenos humanos causando el 12% de las infecciones nosocomiales, entre éstas se incluyen las infecciones del tracto urinario, infecciones intra-abdominales y endocarditis infecciosa. Su naturaleza le permite crecer y sobrevivir en medios ambientes áridos; de esta manera lo podemos encontrar en el suelo, la comida, el agua, las plantas y los animales como pájaros e insectos⁴.

Para que los *Enterococcus* puedan actuar como patógenos primero deben adherirse a los tejidos del hospedero; éstos pueden hacerlo a través de ligandos adhesivos específicos a la matriz extracelular de los mismos. Durante el proceso de invasión a los tejidos, los enterococos deben encontrarse en un medio ambiente con potenciales de óxido reducción elevados, nutrientes esenciales limitados, leucocitos fagocíticos y otras defensas del hospedero. Todos estos factores ayudan a que se expresen genes que favorecen el crecimiento del microorganismo⁵.

Existen 23 especies pertenecientes al Genero *Enterococcus* y éstas a su vez se dividen en 5 grupos basados en su interacción con el manitol, el sorbitol y la arginina. *Enterococcus faecalis* pertenece al mismo grupo del *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii* y *Enterococcus gallinarum*. El *E. faecalis* responde negativamente a la arabinosa y excepto por algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza el piruvato y tolera el telurito⁶.

⁴ Ibid., p 308-20.

⁵ Ibid., p 308-21.

⁶ STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. En: J Endod. Febrero 2006.vol 32, N°2, p 93-8.

Por su parte, *E. faecalis* ha sido el microorganismo patógeno más asociado a las infecciones endodónticas persistentes, siendo aislado frecuentemente de la flora microbiana mixta o de monocultivos. Probablemente este microorganismo es el que mejor se adapta y tolera las condiciones ecológicas existentes en los conductos radiculares obturados, gracias a ciertas características microbiológicas como sus factores de virulencia y su capacidad de formar biopelículas. Por ello, es importante profundizar en dichas características microbiológicas y entender cuál es el papel que desempeña cada una de ellas en el desarrollo, crecimiento y supervivencia del mismo dentro del sistema de conductos radiculares (SCR).

2.1.2 Características microbiológicas del *Enterococcus Faecalis*. *E. faecalis* es un coco Gram positivo que puede aparecer solo, en pares o en cadenas; éstas células pueden aparecer como coco-bacilos cuando se realiza la tinción de Gram en muestras provenientes de placas de Agar o pueden aparecer ovoides o en cadenas cuando se realiza la tinción de Gram en muestras provenientes de caldo de tioglicolato. Éste es un microorganismo anaerobio facultativo y su crecimiento óptimo ocurre a 35°C; sin embargo, también se ha observado crecimiento entre 10 y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en caldos que contengan cloruro de sodio al 6,5% y esculina hidrolizada en presencia de sales biliares al 40% (medio de bilis-esculina). Casi todas las cepas de este microorganismo son homofermentativas, no producen gas, no contienen enzimas citocrómicas y el ácido láctico resulta del producto final de la fermentación de la glucosa⁷.

El *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico glicerol intracelular asociado con la membrana citoplasmática. La pared celular está constituida por una gran cantidad de peptidoglicanos y ácido teicoico⁸.

⁷ Ibid., p 93-8.

⁸ Ibid., p 93-9.

Una característica importante del *E. faecalis* es su habilidad de crecer en medios con pH ácido y alcalino, donde este último normalmente inhibe el crecimiento y supervivencia de muchos otros microorganismos. Con relación a esto, McHugh y colaboradores evaluaron el pH necesario para inhibir su crecimiento y el experimento in vitro demostró que se necesita un pH mayor de 11,0 para la erradicación de este microorganismo⁹.

Junto con la propiedad de sobrevivir a medios ambientes con pH ácidos o alcalinos, el *E. faecalis* ha demostrado también ser capaz de formar comunidades microbianas adheridas a superficies o "biopelículas"¹⁰.

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos adheridas a una superficie y embebidas en una matriz de polisacáridos y proteínas formando una capa viscosa. La matriz representa generalmente el 85% del volumen de la biopelícula¹¹.

En relación a esto, se han realizado numerosas investigaciones donde se afirma la capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas y así poder sobrevivir a ciertas medicaciones intraconducto y a diversos protocolos de irrigación. Uno de ellos es el trabajo realizado por George y colaboradores, quienes evaluaron la influencia de distintas condiciones ambientales y nutricionales en las características de las biopelículas formadas por *E. faecalis* en el SCR y su penetración dentro de los túbulos dentinarios. Las condiciones ambientales estudiadas fueron medios ambientes aerobios y anaerobios ricos y pobres en nutrientes¹².

⁹ MCHUGH CP, ZHANG P, MICHALEK S, ELEAZER PD. pH required to kill Enterococcus faecalis in vitro. En: J Endod. Abril 2004.vol 30, N°4, p 218-9.

¹⁰ STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. Op Cit., p 93-8.

¹¹ Ibid., p 93-8

¹² George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. En: J Endod. Diciembre 2005.vol 31, N°12, p 867-72.

En general, los investigadores señalan que la población bacteriana observada fue mayor cuando las condiciones ambientales eran ricas en nutrientes, que cuando eran escasos, por lo que se puede afirmar que el desarrollo y modificación de las biopelículas formadas por *E. faecalis* en el conducto radicular y su penetración dentro de los túbulos dentinarios se ve modulada por las condiciones ambientales prevalentes¹³.

Al conocerse la capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas dentro del SCR, muchos investigadores se vieron en la necesidad de evaluar el efecto antimicrobiano de ciertas soluciones irrigantes, quelantes, medicaciones intraconducto e incluso antibióticos sobre estas biopelículas. Así lo demuestran Giardino y colaboradores quienes compararon el efecto antimicrobiano del hipoclorito de sodio al 5,25%, Biopure MTAD® y Tetraclean® sobre biopelículas formadas por *E. faecalis* generadas en filtros de membranas de nitrato celuloso. Los tiempos de evaluación fueron a los 5, 30 y 60 minutos¹⁴.

Los resultados señalan que el hipoclorito de sodio al 5,25% fue el único irrigante probado capaz de remover la biopelícula luego de 5 minutos de exposición, mientras que el Tetraclean® lo hizo a los 60 minutos. El MTAD Biopure® no pudo remover la biopelícula en ninguno de los tiempos evaluados¹⁵.

Con relación a la capacidad antibacteriana de ciertas sustancias antimicrobianas sobre biopelículas formadas por *E. faecalis*, Lima y colaboradores evaluaron la efectividad de medicamentos basados en antibióticos y con Clorhexidina, en la eliminación de estas biopelículas¹⁶.

¹³ Ibid., p 867-72.

¹⁴ GIARDINO L, AMBU E, SAVOLDI E, RIMONDINI R, CASSANELLI C, DEBBIA EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. En: J Endod. Julio 2007. vol 33, N°7, p 852-5.

¹⁵ Ibid., p 852-5.

¹⁶ LIMA KC, FAVA LR, SIQUEIRA JF, JR. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. En: J Endod. Octubre 2001. vol 27, N°10, p 616-9.

Estos autores señalaron que la Clorhexidina es una molécula catiónica que ejerce su efecto antibacterial interrumpiendo la integridad de la membrana citoplasmática bacteriana, causando filtración de los contenidos intracelulares. En altas concentraciones, la precipitación del citoplasma bacteriano ocurre como resultado de la interacción entre la Clorhexidina y las entidades fosfatadas, como adenosín trifosfato y los ácidos nucleicos. De allí que los medicamentos que contienen Clorhexidina sean capaces de eliminar casi la totalidad de microorganismos presentes en las biopelículas¹⁷.

Muchos son los estudios que reflejan la presencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas; sin embargo, el porcentaje de prevalencia de este microorganismo puede variar considerablemente si se utilizan métodos de cultivo tradicional o las nuevas técnicas de detección microbiológica como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) entre otras.

A continuación se expondrán con más detenimiento cada uno de los métodos de detección que han sido utilizados para evidenciar la presencia de *E. faecalis* en las infecciones endodónticas, así como los estudios que soportan los distintos porcentajes de prevalencia del mismo.

2.1.3 Métodos de detección de *Enterococcus faecalis*. Los primeros estudios microbiológicos de infecciones endodónticas fueron llevados alrededor de los años '60 usando el microscopio, técnicas de cultivo aeróbicas, y reacciones bioquímicas, para poder detectar e identificar los microorganismos preponderantes en dichas lesiones. Así han sido cultivadas más de 500 especies bacterianas provenientes de la cavidad oral¹⁸.

¹⁷ Ibid., p 616-9.

¹⁸ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-- current molecular technologies for microbiological diagnosis. En: J Endod. Enero2005.vol 31, N°6, p 411-23.

Numerosas investigaciones revelan que las infecciones endodónticas son polimicrobianas constituídas, aproximadamente, por 3 a 12 especies de microorganismos cultivables de conductos radiculares infectados o abscesos periapicales. Actualmente, las nuevas técnicas de detección molecular son capaces de identificar numerosas especies adicionales de microorganismos asociados con dichas infecciones endodónticas. Estos métodos proporcionan una identificación precisa de los microorganismos a nivel del ADN y la detección de aquellos que no han podido ser cultivados¹⁹.

2.1.3.1 Cultivo y Observación Microscópica. Esta técnica tradicional consiste en sembrar las muestras del conducto radicular utilizando medios para cultivo de microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos, que indiquen las proporciones relativas de cepas presentes. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de los factores específicos de crecimiento que son utilizados por numerosos microorganismos para sobrevivir, en cualquier medio ambiente, incluyendo el cuerpo humano, por lo que no se puede determinar con exactitud si se replican exactamente las condiciones necesarias para su crecimiento²⁰.

Las principales ventajas de las técnicas tradicionales de cultivo están relacionadas con su naturaleza de amplio rango, lo cual hace posible la identificación de una gran cantidad de especies microbianas en una muestra. Además, el cultivo hace posible la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados, estudiar su fisiología y patogenicidad²¹.

Sin embargo, las propuestas de identificación basadas en cultivo presentan numerosas limitaciones: toma una cantidad determinada de tiempo identificar algunas cepas de microorganismos anaerobios, lo cual puede retrasar el tratamiento antimicrobiano, presenta una baja sensibilidad, particularmente para aquellas cepas de microorganismos anaerobios, su especificidad es baja y

¹⁹ Ibid., p 411-23.

²⁰ Ibid., p 411-24.

²¹ Ibid., p 411-25.

dependiente de la experiencia del microbiólogo, presenta dependencia estricta en el modo de transporte de la muestra y es laborioso y requiere de tiempo²².

A pesar de las condiciones dadas en los métodos de cultivo tradicionales para la detección de la microbiota endodóntica, algunos microorganismos no pueden ser cultivados por numerosas razones; entre ellas: la ausencia de nutrientes esenciales o factores de crecimiento en los medios de cultivo artificiales, la toxicidad del medio de cultivo per se, lo cual puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, la producción de sustancias inhibitorias del microorganismo solicitado por parte de otros microorganismos presentes en el medio ambiente mixto, la dependencia metabólica de otras especies para el crecimiento y el reposo bacteriano, el cual es un estado de baja actividad metabólica que desarrollan algunas bacterias bajo ciertas condiciones de estrés, como la falta de nutrientes²³.

Una de las ventajas más importantes del microscopio es que provee una rápida y poco costosa información, pero las características morfológicas no son comúnmente adecuadas para identificar un microorganismo en cuanto a su especie. Además de esto, el microscopio tiene una sensibilidad y especificidad limitada para detectar microorganismos en muestras clínicas; esto se refiere a que se necesita de un número relativamente grande de células microbianas para que puedan ser observadas bajo el microscopio^{24, 25}.

Por todo esto, numerosos investigadores se vieron en la necesidad de ir más allá en la búsqueda y detección de microorganismos presentes en las infecciones endodónticas; junto con el avance de la ciencia y la tecnología, la identificación de estos microorganismos a través de métodos moleculares se ha hecho un

²² Ibid., p 411-26.

²³ Ibid., p 411-23.

²⁴ Ibid., p 411-24.

²⁵ SASSONE LM, FIDEL RA, FAVERI M, GUERRA R, FIGUEIREDO L, FIDEL SR, et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. En: J Endod. Mayo 2008.vol 34, N°5, p 541-5.

procedimiento mucho más certero, exacto y específico donde se han podido detectar, además de las especies prevalentes hasta el momento, nuevas especies que también están involucradas en dichas infecciones endodónticas y que tienen una participación importante en la persistencia de las lesiones perirradiculares²⁶.

2.1.3.2 Métodos moleculares. Las técnicas moleculares han reducido la dependencia de los laboratorios microbiológicos clínicos a los métodos basados en cultivos, dando paso a nuevas oportunidades de estudios microbiológicos. Para dichos métodos, los objetivos fundamentales para el procesamiento de la muestra es la liberación del ácido nucleico del microorganismo, mantener la integridad del mismo, mantener la muestra no infectada y remover las sustancias inhibitorias²⁷.

Los métodos de diagnóstico moleculares presentan numerosas ventajas sobre otros métodos de identificación microbiana. Entre éstas tenemos: detección no sólo de las especies cultivables sino también de las no cultivables, alta especificidad e identificación precisa de variedades microbianas con comportamientos fenotípicos ambiguos, incluyendo especies convergentes y divergentes, detección de especies de microorganismos en muestras sencillas, sin la necesidad de cultivo, alta sensibilidad, menos tiempo de preparación para el estudio, ofrecen un diagnóstico rápido, el cual es particularmente ventajoso en casos de enfermedades mortales o enfermedades causadas por el crecimiento lento de microorganismos, no requieren de condiciones anaeróbicas cuidadosamente controladas durante su muestreo y transporte, lo cual es ventajoso desde que algunas bacterias anaerobias y otros microorganismos frágiles perdían la viabilidad durante su transporte y pueden ser usados durante el tratamiento antimicrobiano^{28, 29}.

²⁶ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit., p 411-23.

²⁷ Ibid., p 411-23.

²⁸ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit., p 411-23.

²⁹ SASSONE LM, FIDEL RA, FAVERI M, GUERRA R, FIGUEIREDO L, FIDEL SR, et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. En: J Endod. Mayo 2008.vol 34, N°5, p 541-5.

Las propuestas moleculares de identificación microbiana parten de la premisa de que ciertos genes contienen información relevante acerca de la identidad microbiana. Idealmente, el gen que va a ser usado como blanco para la identificación microbiana debe contener regiones que son únicas para su especie. El gen 16S ADN-r está presente en casi todas las bacterias; éste presenta algunas regiones que son casi idénticas en todas las bacterias denominadas regiones conservadas, y otras regiones que varían en secuencia de una especie a otra denominadas regiones variables. Las regiones variables en el gen 16S ADN-r son los únicos detalles que permiten la identificación bacteriana³⁰.

Entre los métodos moleculares empleados para la detección del *E. faecalis* se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y algunas variantes o ensayos derivados de esta tecnología como la transcriptasa reversa, entre otros. Todos ellos basados en la replicación in vitro del ADN del microorganismo.

2.1.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El método molecular PCR está basado en la replicación in vitro del ADN a través de ciclos repetitivos de desnaturalización, reunión de los cebadores y pasos de extensión. Así, el ADN blanco que sirve como plantilla se funde a temperaturas suficientemente altas como para desligar los puentes de hidrógeno pero manteniendo las cadenas juntas y de esta manera son liberadas cadenas simples de ADN. Posteriormente, dos oligonucleótidos cortos (cebadores) se reúnen en secuencias complementarias de cadenas opuestas del ADN blanco^{31, 32}.

El cebador (oligonucleótido) es una pequeña porción de ADN sintetizado, cuya función es complementar la secuencia de ADN de los genes microbianos que van

³⁰ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit., p 411-23.

³¹ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Enero 2004.vol 97, N°1, p 85-94.

³² SEDGLEY C, NAGEL A, DAHLEN G, REIT C, MOLANDER A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. En: J Endod. Marzo 2006.vol 32, N°3, p 173-7.

a ser estudiados. Los cebadores son seleccionados para rodear el material genético deseado, definiendo los dos puntos finales del fragmento de ADN que va a ser copiado. A una temperatura ligeramente mayor, la enzima ADN polimerasa se une a los cebadores y añade nucleótidos para extender la segunda cadena. En ciclos subsecuentes, se repiten los pasos de desnaturalización, reunión y extensión para hacer copias adicionales de ADN. Cada copia nueva sirve como plantilla para la amplificación en ciclos futuros. Luego de 30 ciclos, se han producido millones de copias de la secuencia blanco provenientes de una simple molécula inicial^{33,34}.

En esta técnica molecular de detección microbiológica, son utilizados cebadores específicos para cada gen microbiano que va a ser estudiado y así obtener resultados más específicos y certeros.

Así mismo, numerosos investigadores estudiaron la prevalencia de *E. faecalis* comparando métodos moleculares con técnicas de cultivo microbiológico tradicional. Autores como Sedgley y colaboradores compararon el método de cultivo tradicional con PCR cuantitativo en Tiempo Real para detectar y cuantificar cepas de *E. faecalis*. Las muestras fueron obtenidas de conductos radiculares de dientes referidos a tratamiento endodóntico por sospecha de una infección endodóntica persistente o en dientes donde ya había sido iniciado el tratamiento. Sus resultados señalan que este microorganismo fue detectado en 9 (10,2%) de 88 muestras endodónticas a través del cultivo, y en 70 (79,5%) de 88 muestras a través de PCR cuantitativo en tiempo real³⁵.

2.1.3.4 Transcriptasa reversa PCR. El método de transcriptasa reversa PCR fue desarrollado para amplificar los ARN blanco y aumentar el uso de la enzima transcriptasa reversa, la cual puede sintetizar una cadena de ADN complementaria

³³ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit. P 173-7.

³⁴ SEDGLEY C, NAGEL A, DAHLEN G, REIT C, MOLANDER A. Op cit. P. 173-7

³⁵ Ibid., P. 173-7.

de un modelo de ARN. La mayoría de los ensayos de transcriptasa reversa PCR proponen dos pasos. En el primero, la transcriptasa reversa convierte el ARN en una simple cadena complementaria de ADN. En el segundo paso se añaden los cebadores para PCR, el ADN polimerasa y los nucleótidos para crear la segunda cadena complementaria de ADN. Una vez que la doble cadena complementaria de ADN está formada, ésta puede ser utilizada como modelo para la amplificación como un PCR convencional^{36, 37}.

Esta variación o ensayo de la técnica original PCR también ha sido utilizada para la detección de microorganismos presentes en el SCR, entre ellos *E. faecalis*. Williams y colaboradores compararon la presencia de este microorganismo utilizando tres métodos de detección microbiológica: cultivo, PCR cuantitativo en tiempo real y Transcriptasa reversa PCR. Se tomaron tres muestras: S1, luego del acceso coronal, S2, luego de la instrumentación e irrigación y S3, luego de la medicación intraconducto con hidróxido de calcio, de 29 dientes a estudiar, es decir, 87 muestras en total³⁸. Los resultados señalan que *E. faecalis* fue hallado en 3 dientes (10,3%) por el método de cultivo tradicional, y en 16 dientes (55,1%) por la técnica molecular PCR cuantitativo en tiempo real. A su vez, todas las cepas de *E. faecalis* halladas por PCR cuantitativo fueron positivas al examen con transcriptasa reversa PCR. Estos autores concluyeron que ambos métodos de detección molecular son mucho más sensibles que el cultivo tradicional para la detección de microorganismos en muestras clínicas endodónticas³⁹. Sin embargo, estos ensayos moleculares derivados del PCR presentan algunas limitaciones: la mayoría de los ensayos de PCR usados con propósitos de identificación cualitativa, detectan al microorganismo en cuestión, más no su nivel en la muestra. Los resultados cuantitativos, sin embargo, pueden ser obtenidos por ensayos de PCR en tiempo real, en aquellos microorganismos con paredes celulares gruesas,

³⁶ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit. P 173-7.

³⁷ SEDGLEY C, NAGEL A, DAHLEN G, REIT C, MOLANDER A. Op cit. P. 173-7

³⁸ SEDGLEY C, BUCK G, APPELBE O. Prevalence of Enterococcus faecalis at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. En: J Endod. Febrero 2006.vol 32, N°2, p 104-9.

³⁹ Ibid., p 104-9.

como los hongos, pueden llegar a ser difíciles de romper y podrían requerirse pasos adicionales para la lisis y consecuente liberación de ADN, existe una alta posibilidad de que se obtengan resultados falsos positivos, debido a la amplificación por PCR de un ADN contaminado y pueden ocurrir falsos negativos debido a la presencia de enzimas inhibitorias o nucleasas en las muestras clínicas, lo cual podría retrasar la reacción de amplificación y degradar la plantilla de ADN, respectivamente⁴⁰.

A pesar de dichas limitaciones está demostrado que las técnicas moleculares y los ensayos derivados de las mismas, son herramientas importantes en la nueva era de detección microbiológica, donde se conoce la existencia de microorganismos que no son cultivables y que sólo pueden ser detectados a través de técnicas más específicas y sensibles como el PCR. Por ende, al identificar los principales microorganismos asociados a las infecciones endodónticas, se pueden agotar todos los recursos indispensables para la erradicación de los mismos y así garantizar una terapia mucho más predecible con resultados más acertados.

2.1.4 Incidencia de *Enterococcus faecalis* en las infecciones endodónticas.

Una gran cantidad de estudios e investigaciones indican que las enfermedades perirradiculares son desórdenes de tipo infeccioso. La lista de microorganismos involucrados en las enfermedades perirradiculares aumenta día a día, y tiene el potencial de aumentar más en los próximos años gracias a los avances de los métodos moleculares en cuanto a identificación y detección de microorganismos⁴¹.

En esencia, una infección endodóntica no es más que la infección del SCR del diente, siendo ésta el agente etiológico primario de las diferentes formas de enfermedades inflamatorias perirradiculares. Luego que se establece la infección endodóntica, estos microorganismos entran en contacto directo con los tejidos

⁴⁰ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN. Op cit. P 173-7.

⁴¹ SIQUEIRA JF, JR. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Septiembre 2002.vol 94, N°3, p 281-93.

perirradiculares a través del foramen apical o foraminas accesorias, ocasionando daño a estos tejidos y a la vez suscitando cambios inflamatorios⁴².

2.1.4.1 Control microbiológico de *Enterococcus Faecalis*. Uno de los objetivos biológicos de la terapia endodóntica es la eliminación de los microorganismos del SCR. Debido a la anatomía compleja del mismo, una desinfección efectiva sólo se logra con una adecuada preparación biomecánica junto con la acción de los irrigantes antimicrobianos⁴³.

Como se ha mencionado anteriormente, *E. faecalis* ha sido asociado a las lesiones periapicales persistentes, y gracias a sus características fenotípicas y a la presencia de determinados factores de virulencia, este microorganismo es capaz de sobrevivir en medios con pocos o escasos nutrientes, así como de invadir espacios o aberraciones anatómicas donde acciones como la preparación biomecánica, la colocación de medicación intraconducto o la utilización de irrigantes no son capaces de actuar y eliminarlo⁴⁴.

A continuación se expondrán diversos estudios donde se trata de controlar la presencia de *E. faecalis*, con irrigantes como el Hipoclorito de Sodio y el Digluconato de Clorhexidina y con cementos de obturación como el MTA.

2.1.4.2 Control microbiológico con medicación local

2.1.4.2.1 Irrigantes. Muchos han sido los protocolos de irrigación utilizados para la erradicación de *E. faecalis* del SCR infectado. Entre los irrigantes mayormente usados se encuentra el hipoclorito de sodio (NaOCl), el Digluconato de Clorhexidina (CHX), entre otros.

⁴² SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN.. Op cit., p 411-23.

⁴³ STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. Op Cit., p 93-8.

⁴⁴ Ibid., p 93-8.

2.1.4.2.2 Hipoclorito de sodio. Muchas soluciones han sido consideradas como irrigantes endodóntico, cada una con sus ventajas y desventajas, sin embargo el hipoclorito de sodio es la alternativa más recomendada para la irrigación del sistema de conductos.

El hipoclorito de sodio cuya fórmula química es NaOCl fue introducido durante la primera guerra mundial. Dakin introdujo el uso del hipoclorito de sodio al 0.5% y 0.6% como antiséptico en heridas infectadas. Basado en este reporte, el NaOCl fue recomendado como irrigante por Coolidge en 1919. En 1936, Walker inició el uso del NaOCl al 5% como irrigante de conductos⁴⁵.

Desde entonces el NaOCl se ha postulado como el irrigante más popular en endodoncia por su capacidad para disolver tejido y por su amplio espectro antimicrobiano, ya que este elimina rápidamente formas vegetativas de bacterias, esporas, hongos y virus⁴⁶.

El NaOCl ejerce su acción antibacteriana por medio del contacto directo con el microorganismo o por vaporización. No se ha demostrado experimentalmente como destruye exactamente el microorganismo, pero la eficacia en la desinfección depende de la concentración del ácido hipocloroso (HClO) no disociado en solución. El HClO ejerce su efecto germicida por medio de una acción oxidativa en el grupo sulfidril de las enzimas de las bacterias, estas enzimas esenciales son inhibidas y posteriormente se va a presentar un rompimiento de las reacciones metabólicas, dando como resultado la muerte celular de las bacterias; el cloro también puede combinarse con componentes citoplasmáticos de las bacterias formando complejos tóxicos que destruyen al microorganismo^{47, 48}.

⁴⁵ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN, SANTOS SR, LIMA KC, MAGALHAES FA, DE UZEDA M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. En: J Endod. Marzo 2002.vol 28, N°3, p 181-4.

⁴⁶ SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN, SANTOS SR, LIMA KC, MAGALHAES FA, DE UZEDA M. p 181-4

⁴⁷ AYHAN H, SULTAN N, CIRAK M, RUHI MZ, BODUR H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. En: Int Endod J. Marzo 1999.vol 32, N°2, p 99-102.

Una característica del NaOCl es que tiene un pH de aproximadamente 10 – 12, por su pH alcalino neutraliza la acidez del medio evitando el desarrollo bacteriano. Los reportes acerca del NaOCl se refieren a la concentración y pH adecuado para la acción bactericida⁴⁹.

Por ejemplo existen reportes donde al usar una concentración de 5.25% con pH de 11 a 12 ejerce su acción antibacteriana inmediatamente. Una concentración del 1% con pH de 8.9 fue capaz de eliminar la mayoría de microorganismos presentes en pulpas necróticas. Sin embargo en otro estudio se encontró que el efecto antibacteriano del NaOCl contra el *Enterococcus faecalis* cayó dramáticamente cuando una concentración del 5.25% fue diluida a un 1%⁵⁰.

El NaOCl también presenta propiedades negativas como la corrosión del instrumental endodóntico, inefectividad para algunos microorganismos cuando es utilizado a bajas concentraciones, por sí solo no remueve el barro dentinario ya que sólo actúa sobre la materia orgánica de la pulpa y la predentina; además presenta el riesgo de sobrepaso de NaOCl a los tejidos periapicales y es potencialmente alérgico y citotóxico⁵¹.

El hipoclorito de sodio ha sido utilizado como el irrigante de elección para la limpieza del SCR desde hace varias décadas, y en varias concentraciones, al 0,5%, 1%, 2% y 5,25%. Las principales ventajas que ha demostrado tener el NaOCl son su habilidad de disolución de tejidos orgánicos y su propiedad antibacteriana contra la mayoría de los microorganismos.

⁴⁸ GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. En: Int Endod J. Septiembre 2001.vol 34, N°6, p 424-8.

⁴⁹ HAUMAN CH, LOVE RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. En: Int Endod J.Febrero 2003.vol 36, N°2, p 75-85.

⁵⁰ Ibid., p 75-85.

⁵¹ HELING I, CHANDLER NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. En: Int Endod J. Enero 1998.vol 31, N°1, p 8-14.

Siquiera y colaboradores evaluaron *in vitro* la efectividad del NaOCl al 4% usando tres métodos de irrigación en la eliminación de *E. faecalis* del SCR. Los tres métodos fueron los siguientes: a) irrigación con 2ml de NaOCl y agitación con limas manuales; b) irrigación con 2ml de NaOCl y agitación ultrasónica; c) irrigación con NaOCl alternado con peróxido de hidrógeno; y el grupo control fue irrigado con solución salina. Sus resultados señalan que no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales; sin embargo, estos autores afirman que el NaOCl, utilizado en cualquiera de estos tres métodos, fue significativamente más efectivo que la solución salina, al desinfectar los conductos radiculares⁵².

A pesar de que está demostrado que el efecto mecánico de la irrigación reduce el número de bacterias en el conducto radicular, los hallazgos de este estudio sugieren que se requiere de una solución irrigante que posea acción antibacterial para maximizar la desinfección del SCR. De igual forma demuestran que no existe diferencia significativa entre los protocolos de irrigación utilizados. Los efectos observados en este estudio son dependientes del NaOCl más que del método de irrigación empleado⁵³.

Otro grupo de autores como Abdullah y colaboradores evaluaron la acción antimicrobiana del NaOCl al 3% en fenotipos diferentes de *E. faecalis*, como son una biopelícula y una suspensión planktónica. Cada una de las muestras del microorganismo fue expuesta al NaOCl en períodos de tiempo de 1, 2, 4, 8, 15,30 y 60 minutos. Los resultados señalan que el NaOCl fue capaz de lograr una reducción bacteriana al 100% cuando estuvo en contacto por 1 minuto con el microorganismo en su forma de suspensión planktónica y en 2 minutos cuando se encontraba formando una biopelícula⁵⁴.

⁵² SIQUEIRA JF, JR., MACHADO AG, SILVEIRA RM, LOPES HP, DE UZEDA M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. En: Int Endod J. Julio 1997.vol 30, N°4, p 279-82.

⁵³ Ibid., p 279-82

⁵⁴ ABDULLAH M, NG YL, GULABIVALA K, MOLES DR, SPRATT DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. En: J Endod. Enero 2005.vol 31, N°1, p 30-6.

Estos autores apuntan que es difícil la erradicación de cualquier microorganismo que se encuentre en una biopelícula o en una suspensión planktónica *in vitro* si el agente antimicrobiano a utilizar no posee propiedades de disolución de tejido orgánico. Los mecanismos utilizados para la erradicación de las infecciones por biopelículas de *E. faecalis* se basan en la interrupción mecánica de la estructura multicelular, gracias a la instrumentación y disolución de los polímeros de la matriz utilizando NaOCl al 3% como protocolo principal de irrigación⁵⁵.

En este mismo sentido, Sena y colaboradores evaluaron la efectividad del NaOCl al 2,5% y al 5,25% sobre biopelículas de *E. faecalis*, así como biopelículas de *S. aureus*, *P. endodontalis* y *F. nucleatum*. Estas biopelículas eran inmersas en la solución irrigadora por 30 segundos, y luego por períodos de tiempo de 5, 10, 15, 30 y 60 minutos, con y sin agitación mecánica⁵⁶. En sus resultados señalan que se necesitaron 30 segundos de contacto, con agitación mecánica, entre la biopelícula de *E. faecalis* y el NaOCl al 5,25% para lograr su erradicación. Por otro lado, sin agitación mecánica, el NaOCl al 5,25% actuó sobre este microorganismo en la misma cantidad de tiempo, pero a una concentración de 2,5% tardó 60 minutos en lograr la erradicación del mismo⁵⁷.

Sena y colaboradores afirman que los microorganismos Gram positivos anaerobios facultativos como los *Enterococos*, son más resistentes a la instrumentación y a los agentes antisépticos, por lo que se puede esperar su persistencia dentro del SCR luego de una preparación biomecánica y obturación inadecuadas⁵⁸.

⁵⁵ Ibid., p 30-6.

⁵⁶ SENA NT, GOMES BP, VIANNA ME, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. En: Int Endod J. Noviembre 2006.vol 39, N°11, p 878-85.

⁵⁷ Ibid., p 878-85.

⁵⁸ Ibid., p 878-85.

Por su parte, Vianna y colaboradores y Gomes y colaboradores evaluaron la efectividad antimicrobiana del NaOCl en concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 4 y 5.25%, sobre *E. faecalis*. Ambos grupos de investigadores señalan que el tiempo requerido para la erradicación total del microorganismo fue inversamente proporcional a la concentración del mismo; así, el NaOCl al 5,25% erradicó a *E. faecalis* en 15-30 segundos de contacto y a una concentración de 0,5% tardó 30 minutos^{59, 60}.

2.1.4.2.3 Digluconato de Clorhexidina. El gluconato de Clorhexidina es una 4bisbiguanida catiónica, compuesta de dos anillos clorofenólicos, y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno, con dos cargas positivas en cada extremo del puente. Contiene 0.12% de gluconato de Clorhexidina en un base que contiene agua, 11.6% de alcohol, glicerina y agentes saborizantes⁶¹.

Ha sido utilizada desde 1950 a diferentes concentraciones como antiséptico oral en forma de enjuagues, irrigante subgingival, gel y crema dental. En endodoncia se ha utilizado como solución irrigante, pero siempre en presentación líquida, la presentación en gel se ha evaluado como medicamento intraconducto mostrando también buenos resultados⁶².

La Clorhexidina presenta un amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas, esporas bacterianas, virus lipofílicos y dermatofitos; actúa sobre la membrana citoplasmática de la bacteria a un pH de 5.5-7.0 desintegrándola y

⁵⁹ GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Op cit., p 424-8.

⁶⁰ VIANNA ME, GOMES BP, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE SOUZA-FILHO FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Enero 2004.vol 97, N°1, p 79-84.

⁶¹ FERGUSON DB, MARLEY JT, HARTWELL GR. The effect of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: long-term results. En: J Endod. Febrero 2003.vol 29, N°2, p 91-4.

⁶² GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Op cit., 424-8.

provocando de esta manera la salida de los componentes intracelulares al perderse el balance osmótico^{63,64}.

A bajas concentraciones de Clorhexidina, sustancias de bajo peso molecular salen, especialmente potasio y fósforo, provocando de esta forma el efecto bacteriostático. Por lo contrario, a altas concentraciones, la Clorhexidina tiene efecto bactericida debido a la precipitación y/o coagulación del citoplasma⁶⁵.

Dentro de sus grandes desventajas tenemos que la Clorhexidina presenta inhabilidad para disolver tejido orgánico lo cual ha sido un problema, por lo tanto se ha visto la manera de usar una combinación de Clorhexidina e hipoclorito en baja concentración, ya que se incrementaría la capacidad ionizante de la molécula de Clorhexidina y la solución podría elevar su pH al usar 2.5% de NaOCl con pH de 9 y 0.2% de gluconato de Clorhexidina con pH de 6.5, obteniendo una solución con pH de 10 y de esta forma contribuir a una acción antimicrobiana adicional con una propiedad de disolución de tejido mejor que la obtenida con el gluconato de Clorhexidina solo. Sin embargo la combinación de Clorhexidina y NaOCl no supera la eficacia del uso de NaOCl solo en alta concentración⁶⁶.

El Digluconato de Clorhexidina (CHX) ha sido recomendado para la irrigación del SCR de dientes infectados debido a su acción antimicrobiana y a su absorción por parte de los tejidos dentarios duros con una liberación gradual y prolongada a niveles terapéuticos, llamado frecuentemente efecto residual o sustantividad. Sin

⁶³ FERGUSON DB, MARLEY JT, HARTWELL GR. The effect of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: long-term results. En: J Endod. Febrero 2003.vol 29, N°2, p 91-4.

⁶⁴ LEONARDO MR, TANOMARU FILHO M, SILVA LA, NELSON FILHO P, BONIFACIO KC, ITO IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. En: J Endod. Marzo 1999.vol 25, N°3, p 167-71.

⁶⁵ FERGUSON DB, MARLEY JT, HARTWELL GR. Op cit., 167-71.

⁶⁶ KURUVILLA JR, KAMATH MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. En: J Endod. Julio 1998.vol 24, N°7, p 472-6.

embargo, la inhabilidad de la Clorhexidina de disolver tejido orgánico ha sido un problema⁶⁷.

En un estudio realizado por Dametto y colaboradores se evaluó la actividad antimicrobiana del gel de CH al 2% sobre *E. faecalis*, comparándolo con otros irrigantes como la CH líquida al 2% y el NaOCl al 5,25%. Para evaluar la acción antibacteriana de dichos irrigantes, se tomaron tres muestras microbiológicas, una muestra inicial antes de la preparación biomecánica, una muestra intermedia inmediatamente después de la preparación y una muestra final 7 días después de la misma⁶⁸. Los resultados señalan que al momento de la muestra intermedia, no hubo diferencias significativas en cuanto al irrigante utilizado y el número de colonias detectadas de *E. faecalis*; sin embargo, a los 7 días de la preparación biomecánica, ambos tipos de CH mostraron la menor cantidad de colonias formadas, muy por encima del NaOCl. Estos autores también apuntan que la CH, tanto en presentación líquida como en gel, es absorbida por el esmalte y la dentina luego de 7 días de la instrumentación e irrigación de los conductos radiculares, y a pesar de que el NaOCl fue igualmente efectivo en la exposición inicial, éste no presenta la propiedad de sustantividad⁶⁹.

En este mismo sentido, Vianna y colaboradores y Gomes y colaboradores realizaron un estudio donde evalúan la efectividad antimicrobiana de la CHX al 0,2%, 1% y 2% en líquido y gel sobre *E. faecalis*. Ambos coinciden en afirmar que el tiempo requerido para la erradicación total del microorganismo fue inversamente proporcional a la concentración del mismo; así, el gel de CHX al 0.2% detuvo el

⁶⁷ DAMETTO FR, FERRAZ CC, GOMES BP, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, DE SOUZA-FILHO FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Junio 2005.vol 99, N°6, p 768-72.

⁶⁸ Ibid., p 768-72.

⁶⁹ Ibid., p 768-73.

crecimiento del microorganismo al minuto, y el líquido de CHX al 2 % necesitó solo 15-30 segundos de contacto para su erradicación^{70, 71}.

Sena y colaboradores coinciden con los estudios de Vianna y Gomes en cuanto al tiempo de contacto que se requiere entre la CHX y *E. faecalis*, para su erradicación. Estos autores evaluaron la acción antimicrobiana de la CHX sobre una biopelícula del microorganismo en cuestión, y a los 30 segundos, se consiguió la eliminación total de *E. Faecalis*⁷².

El Digluconato de Clorhexidina (CHX) a distintas concentraciones ha sido empleado como irrigante del SCR o como medicación intraconducto, sólo o combinado con Ca (OH)₂ entre otros.

Numerosos estudios coinciden en afirmar que la CHX posee mayor poder de erradicación de *E. faecalis* que el Ca (OH)₂.^{73,74}

Autores como Lin, Schafer, Basrani y Gomes y colaboradores utilizaron la CHX como medicación intraconducto por períodos de tiempo de 1 a 15 días y la compararon con muestras donde se utilizó el Ca (OH)₂ solo o donde se combinaban ambas medicaciones, logrando la erradicación total del microorganismo en aquellos grupos donde se utilizaba la CHX sola. Igualmente, evaluaron la presentación en la que se encontraba el medicamento, en gel o líquido, y no encontraron diferencias significativas en cuanto a su efectividad^{75, 76}.

⁷⁰ GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Op cit. P 424-8.

⁷¹ VIANNA ME, GOMES BP, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE SOUZA-FILHO FJ. Op cit. P 79-84.

⁷² SENA NT, GOMES BP, VIANNA ME, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, et al. Op cit. p 878-85.

⁷³ LIN YH, MICKEL AK, CHOGLE S. Effectiveness of selected materials against Enterococcus faecalis: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis. En: J Endod. Septiembre 2003.vol 29, N°9, p 565-6.

⁷⁴ GOMES BP, SOUZA SF, FERRAZ CC, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, VALDRIGHI L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. En: Int Endod J. Abril 2003.vol 36, N°4, p 267-75.

⁷⁵ LIN YH, MICKEL AK, CHOGLE S. Op cit. p 565-6.

⁷⁶ GOMES BP, SOUZA SF, FERRAZ CC, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, VALDRIGHI L, et al. Op cit. p 267-75.

Las propiedades de la CH dentro de los túbulos dentinarios pueden verse aumentadas cuando se retira la capa de desecho de los mismos, gracias a la acción de quelantes que permitan su paso a través de ellos. Así lo demuestran Yang et al, quienes evaluaron la adhesión de *E. faecalis* a bloques de dentina que fueron tratados con EDTA al 17% y CH al 2% por 7 días y evidenciaron menor adhesión del mismos a las paredes destinarias⁷⁷.

Yang y colaboradores, señalan que la CHX empleada como medicación intraconducto gracias a su propiedad de sustantividad, la cual se da por la liberación de moléculas cargadas positivamente provenientes de la dentina tratada con CHX. Estas moléculas liberadas se adhieren a la bacteria, interfiriendo así con su adhesión a la dentina y causando daño en la membrana celular⁷⁸.

Más recientemente, Paquette y colaboradores, en el 2007, evaluaron la eficiencia antibacteriana de la CHX al 2% como medicación intraconducto *in vivo*. En este estudio se utilizaron 22 dientes con periodontitis apical persistente, se instrumentaron en una primera sesión y se medicaron con CHX para ser evaluados 7 y 15 días después. Las muestras fueron obtenidas antes de acceder a la cámara pulpar y luego de la preparación biomecánica en una primera sesión, y antes y después de la irrigación con CHX en una segunda sesión. Sus resultados señalan que a los 7 días de medicación se evidenció una disminución en el número de colonias formadas de un 3%, y a los 14 días de un 19%, lo cual no es una diferencia estadísticamente significativa⁷⁹. Estos autores afirman que la CHX líquida al 2% aplicada *in vivo* como medicación intraconducto de 7 a 15 días no disminuye el número de dientes con cultivos negativos o no reduce el número de bacterias contadas luego de haber realizado la preparación biomecánica en una primera sesión. A pesar de que el crecimiento bacteriano es menor

⁷⁷ YANG SE, CHA JH, KIM ES, KUM KY, LEE CY, JUNG IY. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. En: J Endod. Julio 2006.vol 32, N°7, p 663-7.

⁷⁸ Ibid., p 663-7.

⁷⁹ PAQUETTE L, LEGNER M, FILLERY ED, FRIEDMAN S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication *in vivo*. En: J Endod. Julio 2007.vol 33, N°7, p 788-95.

comparado con otros estudios, los beneficios potenciales de la CHX indicadas en estudios *in vitro*, no pudo ser demostrada *in vivo*⁸⁰.

2.1.5 Efecto antimicrobiano del gluconato de clorhexidina contra hipoclorito.

La Clorhexidina apareció como una alternativa de irrigante con menor efecto citotóxico y buenas propiedades antimicrobianas. Es por eso que el efecto antimicrobiano de la Clorhexidina ha sido evaluado a diferentes concentraciones y comparado en algunos estudios con el NaOCl. Estudios *in vitro* utilizando gluconato de Clorhexidina al 2% como solución irrigante durante la instrumentación de conductos han demostrado su eficiencia antimicrobiana y su actividad residual 72h después de la instrumentación. La utilización de Clorhexidina como solución irrigante con base en estudios *in vivo* muestra que al usarla a bajas concentraciones (0.12- 0.2%) es menos efectiva que si se usan altas concentraciones de NaOCl⁸¹.

En un estudio se evaluó la efectividad del gluconato de Clorhexidina en varias concentraciones al compararlo con NaOCl al 1% como irrigante de conductos, encontrando que esta penetraba en dentina y pulpa bovina e inhibía el crecimiento del *Enterococcus faecalis* desde las 24 horas hasta una semana después pero no había diferencias significativas en relación con el NaOCl, sin embargo en otra investigación se encontró que al usar Clorhexidina al 0.2% en 60 conductos con pulpas necróticas su efectividad fue mucho menor en comparación con el uso de hipoclorito de sodio al 2.5% el cual eliminó sepsis aeróbicas y anaeróbicas⁸².

Tal vez los resultados de estos dos estudios difieren debido a las concentraciones de hipoclorito usadas ya que en uno de los estudios se usó al 1% y en el otro al 2.5% donde se encontró que el NaOCl era mejor, este resultado quizás se obtuvo

⁸⁰ Ibid., p 788-95.

⁸¹ LEONARDO MR, TANOMARU FILHO M, SILVA LA, NELSON FILHO P, BONIFACIO KC, ITO IY. Op cit. p 167-71.

⁸² HELING I, CHANDLER NP. Op cit., p 8-14.

porque al utilizar el NaOCl a mayor concentración su efectividad antimicrobiana también será mayor. Cuando se utilizó NaOCl a baja concentración 1% no hubo diferencias significativas, pero si se emplea al 2.5% el efecto del NaOCl sigue siendo mucho mejor que con la clorhexidina⁸³.

El gluconato de Clorhexidina al 2.0% ha mostrado ser tan efectivo como el NaOCl al 5.25% en cuanto a su acción antimicrobiana en conductos radiculares, ya que posee un amplio y sostenido espectro bactericida, debido a que se absorbe en la célula por la carga negativa de la pared celular bacteriana. La cantidad absorbida, depende de la concentración utilizada, luego, a mayor concentración, mayor acción sobre los microorganismos; cualidad que no tienen otras sustancias irrigantes, por lo tanto su prolongada presencia quizás hace que se mantenga su acción antimicrobiana⁸⁴.

Por otro lado, Ringel en 1982, comparó la eficacia de la Clorhexidina al 0.2% y el NaOCl al 2.25% en 30 dientes con necrosis pulpar y lesión periapical, encontrando mayor efectividad con el NaOCl lo cual fue atribuido a su capacidad de disolución de tejido⁸⁵.

También se realizaron comparaciones *in vitro* en cuanto a la actividad antimicrobiana del NaOCl y la Clorhexidina en concentraciones similares encontrando que ambos son igualmente efectivos como agentes antibacterianos, sin embargo en cuanto a la toxicidad, la Clorhexidina ha demostrado ser mas biocompatible que el NaOCl por lo cual se ha sugerido como sustituto únicamente en aquellos pacientes que son alérgicos al NaOCl⁸⁶.

⁸³ Ibid., p 8-14.

⁸⁴ BUCK RA, ELEAZER PD, STAAT RH, SCHEETZ JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. En: J Endod. Marzo 2001.vol 27, N°3, p 206-8.

⁸⁵ SPRATT DA, PRATTEN J, WILSON M, GULABIVALA K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. En: Int Endod J. Junio 2001.vol 34, N° 4, p 300-7.

⁸⁶ HAUMAN CH, LOVE RM. Op cit. p 75-85.

Ayhan en 1999 evaluó el efecto antimicrobiano de varios irrigantes de conducto tales como NaOCl 5.25%, alcohol 21%, NaOCl 0.5%, Clorhexidina al 2% y solución salina usados contra microorganismos presentes en conductos infectados, encontrando que el NaOCl 5.25% fue efectivo contra todas las cepas microbianas al comparar su habilidad antimicrobiana con los otros irritantes utilizados. También se encontró que al reducir la concentración del NaOCl de 5.25% a 0.5% resulta en la disminución significativa de su efecto antimicrobiano⁸⁷.

Kuruvilla en 1998 evaluó la Clorhexidina al 0.2% y el NaOCl al 2.25% en 40 dientes con lesiones periapicales, encontrando que la Clorhexidina reducía los microorganismos en un 70% comparado con un 60% que reducía el hipoclorito, lo cual no fue estadísticamente significativo⁸⁸.

En otro estudio realizado por Jeansonne en 1994, se evaluó hipoclorito al 5.25% y Clorhexidina al 2% en 20 dientes extraídos; después del tratamiento se evidenció que era mejor la Clorhexidina sin embargo la diferencia no fue significativa con el NaOCl⁸⁹.

Al analizar los estudios comparativos del NaOCl y la Clorhexidina concluimos que tanto el uno como el otro poseen excelente actividad antimicrobiana siempre y cuando se utilicen en altas concentraciones. El NaOCl además de tener esta propiedad, tiene la capacidad de disolver tejido pulpar haciéndolo más eficaz mientras que la Clorhexidina no tiene ésta propiedad; sin embargo, como el NaOCl puede causar reacciones alérgicas, si se está frente a un paciente alérgico, la Clorhexidina es el irrigante de elección en estos casos ya que su actividad antimicrobiana es semejante al NaOCl; a pesar de todo el NaOCl seguirá siendo el irrigante ideal en cualquier tipo de paciente.

⁸⁷ AYHAN H, SULTAN N, CIRAK M, RUHI MZ, BODUR H. Op cit., p 99-102.

⁸⁸ KURUVILLA JR, KAMATH MP. Op cit., p 472-6.

⁸⁹ SPRATT DA, PRATTEN J, WILSON M, GULABIVALA K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. En: Int Endod J. Junio 2001. vol 34, N°4, p 300-7.

2.1.5.1 Control microbiológico con materiales de obturación. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de ciertos materiales que pueden ser utilizados al momento de la obturación definitiva del SCR, todo ello con la intención de erradicar la presencia de *E. faecalis* del interior de los mismos. Uno de estos materiales es el MTA.

Mineral Trióxido Agregado. El Mineral Trióxido Agregado (MTA), consiste en un polvo de partículas finas hidrofílicas, que endurecen en presencia de humedad. El resultado es un gel coloidal que solidifica a una estructura dura en menos de 4 horas^{90,91}. Los principales componentes de este material (Instructivo ProRoot MTA, DENTSPLY Tulsa Dental, Ok) son: 75 % - Silicato tricalcico: 3CaO-SiO_2 , Aluminato tricálcico: $3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$, Silicato dicálcico: 2CaO-SiO_2 , Aluminato férrico tetracálcico: $4\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-Fe}_2\text{O}_3$, 20 % de Oxido de Bismuto: Bi_2O_3 , 4,4 % de Sulfato de calcio dihidratado: $\text{CaSO}_4\text{-2H}_2\text{O}$; 0,6 % de Residuos insolubles: Sílica cristalina; Oxido de calcio; Sulfato de potasio y sodio⁹².

La composición química del MTA fue analizada a través de diversas investigaciones, donde se utilizó la técnica de Rayos X con un espectrómetro de energía dispersa conjuntamente con el microscopio electrónico. El comportamiento del MTA es evaluado tanto en presencia como en ausencia de células, siendo utilizadas células similares a osteoblastos, denominadas Mg-63. El estudio del MTA mostró fases específicas por todo el material. Todo el MTA es dividido en óxido de calcio y fosfato de calcio. Además, el análisis demostró que las formas aparecieron primero como cristales discretos y luego como una estructura amorfa aparentemente sin cristales y con apariencia granular⁹³.

⁹⁰ FISCHER EJ, ARENS DE, MILLER CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. En: J Endod. Marzo 1998.vol 24,N°3, p 176-9.

⁹¹ TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. En: J Endod. Julio 1995.vol 21, N°7, p 349-53.

⁹² Ibid., p 349-54.

⁹³ Ibid., p 349-53.

Propiedades físico-químicas del MTA. La hidratación del polvo del MTA, forma un gel coloidal que solidifica a una estructura dura, aproximadamente en 4 horas. Las características del agregado dependen del tamaño de las partículas, la proporción polvo-agua, temperatura, presencia de humedad y aire comprimido⁹⁴.

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del MTA Torabinejad y colaboradores, realizaron una investigación, donde evaluaron el MTA en comparación con los materiales de obturación de retro obturación más utilizados, como lo son: el Super EBA, la amalgama y el Material de Restauración Intermedia (IRM). En esta investigación se determinan los parámetros que a continuación se exponen⁹⁵.

Valor de PH. El pH obtenido por el MTA después de mezclado es de 10,2 y a las 3 horas, se estabiliza en 12,5. Esta lectura se realizó a través de un pH-metro (Pye, Cambridge UK), utilizando un electrodo de temperatura compensada⁹⁶.

En vista que el MTA presenta, un pH similar al cemento de hidróxido de calcio, luego de aplicar esta sustancia como material de obturación apical, probablemente, este pH pueda inducir la formación de tejido duro⁹⁷.

Radiopacidad. La medida de radiopacidad del MTA es de 7,17 mm de lo equivalente al espesor de aluminio, los estudios evidencian que el MTA es más radiopaco que la gutapercha convencional y que la dentina, distinguiéndose fácilmente en las radiografías⁹⁸.

Tiempo de endurecimiento. El promedio del tiempo de endurecimiento encontrado en diversos trabajos donde se comparan diferentes materiales es de: amalgama: 4 min +/- 30 seg; Súper-EBA: 9 min +/- 30 seg.; IRM: 6 min +/- 30 seg.;

⁹⁴ Ibid., p 349-54.

⁹⁵ Ibid., p 349-55.

⁹⁶ Ibid., p 349-56.

⁹⁷ Ibid., p 349-57.

⁹⁸ Ibid., p 349-53.

y MTA 2 horas 45 min +/- 5 min. Los resultados muestran que la amalgama tiene el tiempo de endurecimiento más corto y el MTA el más largo. Es deseado que el material de obturación, endurezca tan pronto como sea colocado en la cavidad apical sin sufrir una contracción significativa. Esta condición puede permitir una estabilidad dimensional en el material después de su colocación y además disminuye el tiempo que esté sin fraguar, en contacto con el tejido vital; sin embargo, en términos generales a mayor rapidez de fraguado del material, más rápido se contrae. Este fenómeno explica la causa, del porque el MTA filtra menos colorante y bacterias que otros materiales⁹⁹.

Resistencia compresiva. La resistencia compresiva es un factor importante para considerar cuando se coloca el material de obturación en una cavidad que soporte cargas oclusales. Debido a que los materiales de obturación apical no soportan una presión directa, la resistencia compresiva de estos materiales no es tan importante, como en los materiales usados para reparar defectos en la superficie oclusal¹⁰⁰. La fuerza compresiva del MTA en 21 días es de alrededor de 70 Mpa (Megapascales), la cual es comparable a la del IRM y SuperEBA, pero significativamente menor que la amalgama, que es de 311 Mpa¹⁰¹.

Solubilidad. La falta de solubilidad ha sido una de las características ideales de un material de obturación. El desgaste de los materiales de restauración puede ocurrir por los ácidos generados por la bacteria, ácidos presentes en comidas y bebidas, o por desgaste por contacto oclusal¹⁰².

Los materiales de obturación están normalmente en contacto con el fluido del tejido perirradicular hasta que son cubiertos por un tejido conectivo fibroso o el cemento. En términos generales, los trabajos que se han realizado respecto a la

⁹⁹ TORABINEJAD M, WATSON TF, PITT FORD TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. En: J Endod. Diciembre 1993.vol 19, N°1, p 591-5.

¹⁰⁰ TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Op cit., p 349-53.

¹⁰¹ Ibid., p 349-54.

¹⁰² Ibid., p 349-53.

solubilidad de estos materiales (IRM, SuperEBA, Amalgama y MTA) concluyen que no se evidencian signos significativos de solubilidad en agua para el SuperEBA, la amalgama y el MTA, mientras que si se observan para el IRM¹⁰³.

MICROFILTRACIÓN DE PARTÍCULAS

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre filtración de partículas, siendo la penetración de colorantes, uno de los métodos más empleados. Lee y col. (1993) realizan un estudio *in vitro* con el objeto de evaluar el sellado obtenido con MTA, la amalgama y el IRM, cuando son utilizados como material de reparación de perforaciones radiculares, empleando como marcador el azul de metileno. Los resultados demuestran que el IRM y la amalgama muestran una considerable cantidad de penetración sin una diferencia estadísticamente significativa entre estos, mientras que el MTA filtró significativamente menos que estos dos materiales¹⁰⁴.

Torabinejad y colaboradores en 1993, realizaron un estudio *in vitro* para comparar la calidad del sellado del MTA, la amalgama libre de Zinc y el Súper-EBA, utilizando colorante fluorescente de rodamina B y un microscopio mono focal¹⁰⁵.

Los resultados indican que aquellas cavidades obturadas con MTA presentan un menor grado de filtración de colorante, habiendo casos donde el colorante no penetró en absoluto. Las cavidades obturadas con Súper-EBA filtran menos que las obturadas con amalgama; sin embargo, el colorante no sólo penetró en la unión entre el Súper-EBA y las paredes dentinarias, sino que se incorporó dentro del material¹⁰⁶.

¹⁰³ Ibid., p 349-54.

¹⁰⁴ LEE SJ, MONSEF M, TORABINEJAD M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. En: J Endod. Noviembre 1993.vol 19, N°1, p 541-4.

¹⁰⁵ TORABINEJAD M, WATSON TF, PITT FORD TR. Op cit., 591-5.

¹⁰⁶ Ibid., p 591-5.

Torabinejad y colaboradores en 1994, realizaron una investigación donde compararon la cantidad de filtración del colorante en presencia y ausencia de sangre, un aspecto crítico desde el punto de vista clínico; ya que la presencia de humedad y sangre son factores que pueden contaminar la preparación y los materiales de obturación a retro. Los resultados determinan que la filtración en el MTA es significativamente menor que en otros materiales; tanto en presencia como en ausencia de sangre¹⁰⁷.

Cuando un material de obturación no permite el paso de moléculas pequeñas tales como las partículas de colorante, tiene el potencial de prevenir la filtración bacteriana que tienen un tamaño molecular mayor¹⁰⁸.

La técnica de filtración de fluidos permite evaluar la capacidad de un material de resistir la microfiltración, cuando se somete a cambios de presión. La medición del filtrado refleja la totalidad de la filtración acumulada en la interface restauración - dentina y en consecuencia aporta información con valor cuantitativo. Este método es considerado actualmente el más confiable para determinar la capacidad de sellado de los materiales de obturación apical¹⁰⁹.

Yatsushiro y colaboradores en 1998, realizaron un estudio donde compararon la microfiltración del MTA y una amalgama con alto contenido de cobre, cuando estos se utilizan como materiales de obturación en cavidades apicales. Los resultados muestran que la amalgama tiene un rango de filtración comprendido entre 50,8 y 84,1 nl/min, mientras que la conducción en el grupo tratado con MTA tiene un rango entre 6,8 y 10,8 nl/min, demostrando que la amalgama posee una

¹⁰⁷ TORABINEJAD M, HIGA RK, MCKENDRY DJ, PITT FORD TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. En: J Endod. Abril 1994.vol 20, N°4, p 159-63.

¹⁰⁸ Ibid., p 159-63.

¹⁰⁹ BATES CF, CARNES DL, DEL RIO CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. En: J Endod. Noviembre 1996.vol 22, N°11, p 575-8.

Microfiltración significativamente mayor que la del MTA y no demostró una tendencia significativa de filtración con respecto al tiempo¹¹⁰.

Microfiltración de bacterias. Goldman y colaboradores en 1980, señalaron que las bacterias dan una mejor indicación que los colorantes, en las pruebas de microfiltración, de los materiales hidrofílicas. Los colorantes en las pruebas pueden dar falsos positivos si sus moléculas son lo suficientemente pequeñas¹¹¹.

Torabinejad y colaboradores en 1995, determinaron *in vitro* el tiempo necesario para que el *Staphylococcus epidermidis* penetre 3 mm de espesor de la amalgama, el Súper-EBA, el IRM y el MTA cuando se utilizan como materiales de obturación apical. La mayoría de las muestras que fueron obturadas con amalgama, Súper-EBA, o IRM comienzan a filtrar desde los 6 hasta los 57 días. En contraste (8 de 10 especímenes) la mayoría de las muestras cuyos ápices fueron obturados con MTA no mostraron filtración durante el período experimental (90 días). El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre la filtración de amalgama, Súper-EBA, e IRM. Sin embargo, el MTA filtró significativamente menos que los otros materiales de obturación¹¹².

En un estudio realizado por Fischer y colaboradores en 1998, para determinar el tiempo que necesitaba la *Serratia marcescens* para penetrar 3 mm de espesor en los materiales de obturación: Súper EBA, amalgama libre de Zinc, Material Restaurador Intermedio (IRM) y el MTA, utilizados en la obturación de las cavidades apicales. Los resultados ratifican que el MTA presenta una menor Microfiltración bacteriana¹¹³.

¹¹⁰ YATSUSHIRO JD, BAUMGARTNER JC, TINKLE JS. Longitudinal study of the microleakage of two root-end filling materials using a fluid conductive system. En: J Endod. Noviembre 1998.vol 24, N°11, p 716-9.

¹¹¹ GOLDMAN LB, GOLDMAN M, KRONMAN JH, LETOURNEAU JM. Adaptation and porosity of poly-HEMA in a model system using two microorganisms. En: J Endod. Agosto 1980.vol 6,N°8, p 683-6.

¹¹² TORABINEJAD M, RASTEGAR AF, KETTERING JD, PITT FORD TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. En: J Endod. Marzo 1995.vol 21, N°3, p 109-12.

¹¹³ FISCHER EJ, ARENS DE, MILLER CH. Op cit., p 176-9.

A causa del predominio de microorganismos anaerobios en las infecciones de origen endodóntico, la utilización de un modelo de filtración anaerobia es clínicamente relevante, Nakata y colaboradores en 1998, utilizan un modelo de filtración bacteriana anaerobia, para evaluar la calidad del sellado del MTA y la amalgama cuando son utilizados en la obturación de las perforaciones. En este estudio se demuestra que los dientes reparados con MTA permiten una menor Microfiltración bacteriana del *Fusobacterium nucleatum* en comparación a los dientes donde se reparan las perforaciones con amalgama, siendo la diferencia estadísticamente significativa¹¹⁴.

Adaptación marginal. Un material de obturación ideal debe adherirse y adaptarse a las paredes de la dentina. En este sentido, Torabinejad y colaboradores en 1993, realizan un estudio, y evalúan la capacidad de adaptación marginal del MTA, el Súper EBA y la amalgama. Los resultados muestran que excepto para las muestras obturadas con MTA, la mayoría de las raíces seccionadas longitudinalmente muestran la presencia de brechas y vacíos entre el material de obturación y las paredes de la cavidad. El tamaño y la profundidad de las brechas varían entre la amalgama y el cemento Súper-EBA. Las cavidades apicales obturadas con amalgama, tienen un grado más bajo de adaptación a las paredes dentinarias; por el contrario, con el MTA se observa la mayor adaptación y menor cantidad de brechas; presentando también el MTA un significativo menor grado de Microfiltración¹¹⁵.

Torabinejad y colaboradores en 1995, realizaron un estudio donde evaluaron, la adaptación marginal del MTA, la amalgama, el Súper EBA y el Material de Restauración Intermedia (IRM), como materiales de obturación; comparando los cortes longitudinales de estos con réplicas de resina bajo el microscopio electrónico de barrido. En este estudio, la adaptación de los materiales de

¹¹⁴ NAKATA TT, BAE KS, BAUMGARTNER JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. En: J Endod. Marzo 1998.vol 24, N°3, p 184-6.

¹¹⁵ TORABINEJAD M, WATSON TF, PITT FORD TR. Op cit., p 591-5.

obtención a retro se evaluó directamente en cada caso. Los resultados no muestran correlación entre las brechas marginales y el grado de Microfiltración. Como datos de este estudio se observa que el MTA muestra la brecha más pequeña, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre este y los demás materiales de obturación estudiados¹¹⁶.

Resistencia al desplazamiento. En un estudio realizado por Sluyk y colaboradores en 1998, evaluó las propiedades de sellado y retención del MTA cuando este es utilizado como material de reparación de furcación se evidenció que muestra una alta resistencia al desplazamiento a las 72 horas de haber sido colocado, resistencia esta significativamente mayor que la mostrada a las 24 horas de su colocación. Ello indica, que la reacción química continúa luego de la reacción inicial a las 24 horas de sellado, mejorando así la resistencia al desplazamiento¹¹⁷.

Biocompatibilidad. La respuesta del huésped a los materiales en contacto con el tejido es compleja y depende de muchos factores. La resorción ósea y la subsecuente formación dependen de la interacción de los osteoblastos y osteoclastos y cada uno requiere del otro para activarse. La interacción de éstas células está gobernada por hormonas, factores de crecimiento y citoquinas¹¹⁸.

Respuesta inmunológica y celular. Con la finalidad de evaluar las respuestas inmunológicas desencadenadas por el MTA, realizaron un estudio, comparando el MTA y el polimetilmetacrilato (PMA), al examinar una población estandarizada de células y determinar los cambios en la producción de citoquinas, osteocalcina y niveles de fosfatasa alcalina; además de evaluar la adherencia de las células a los

¹¹⁶ TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Op cit., p 349-53.

¹¹⁷ SLUYK SR, MOON PC, HARTWELL GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. En: J Endod. 1998.vol 24, N°11, p 768-71.

¹¹⁸ KOH ET, TORABINEJAD M, PITT FORD TR, BRADY K, MCDONALD F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. En: J Biomed Mater Res. Diciembre 1997.vol 37, N°3, p 432-9.

materiales experimentales. Los resultados muestran que las células sobre el MTA se observan muy próximas y crecen sobre la estructura amorfa no cristalina, (fosfatos) y las áreas de óxido de calcio sólo muestran un pequeño ingreso de células. Se encontró, que aparentemente la fase de fosfato de calcio del MTA, proporciona un sustrato que favorece el ingreso de los osteoblastos¹¹⁹.

En otra investigación realizada por Koh y colaboradores en 1998, estudiaron la citomorfología de los osteoblastos y la producción de las citoquinas en presencia del Agregado Trióxido Mineral (MTA) y el Material de Restauración Intermedia (IRM). La respuesta tisular ante el IRM se caracteriza por la redondez y menor número de células, indicando que es un material tóxico, coincidiendo con los resultados de un estudio de citotoxicidad. El componente tóxico del IRM es el eugenol. El MTA al parecer, ofrece un sustrato biológicamente activo para las células óseas y estimula la producción de las citoquinas¹²⁰.

En conclusión, el MTA parece ofrecer un sustrato propicio en la activación de los osteoblastos y puede estimular la formación de fosfato de calcio; que favorece la comunicación con el contenido celular. Esta fase, no presenta cristales de hidroxiapatita al análisis del microscopio electrónico, lo que ocasiona un cambio en el comportamiento celular, para estimular el crecimiento óseo sobre el sustrato^{121,122}.

Citotoxicidad. La toxicidad de un material de obturación apical se evalúa generalmente utilizando tres pasos: 1° se investiga el material utilizando una serie de ensayos de citotoxicidad *in vitro*, 2° determinar que el material no es citotóxico *in vivo*, se puede implantar en el tejido subcutáneo o el músculo y se evalúa la reacción tisular local. 3° la reacción *in vivo* del tejido blanco versus el material de

¹¹⁹ Ibid., p 432-9.

¹²⁰ KOH ET, MCDONALD F, PITT FORD TR, TORABINEJAD M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. En: J Endod. Agosto 1998.vol 24, N°8, p 543-7.

¹²¹ KOH ET, TORABINEJAD M, PITT FORD TR, BRADY K, MCDONALD F. Op cit., p 432-9.

¹²² KOH ET, MCDONALD F, PITT FORD TR, TORABINEJAD M. Op cit., p 543-7.

prueba se debe evaluar en sujetos humanos o animales. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden no correlacionarse altamente con los obtenidos *in vivo*. Sin embargo, se puede asegurar que, si un material de prueba induce constantemente una fuerte reacción citotóxica en las pruebas de cultivo celular, es muy probable que también ejerza toxicidad en el tejido vivo¹²³.

El MTA tanto fresco como fraguado es significativamente menos tóxico que el Súper EBA y el IRM en todas sus fases, conclusión que se desprende cuando se analiza utilizando métodos de extendido en agar y la liberación de corno radioactivo¹²⁴.

En otro estudio realizado por Osorio y colaboradores 1998 donde se midió la citotoxicidad de algunos selladores de conductos radiculares, Endomet, CRCS y AH26 y de los materiales de obturación apical a retro: amalgama, Gallium GF2, Ketac Silver, Agregado Trióxido Mineral y Súper EBA, se corrobora el bajo grado de citotoxicidad que presenta el MTA en comparación con los otros materiales utilizados en esta investigación¹²⁵.

Pruebas de implantación. Debido a la limitación de las pruebas de citotoxicidad, se recomiendan las técnicas de implantación subcutánea *in vivo* e intraósea en pequeños animales de laboratorio¹²⁶.

Los resultados de los estudios de implantación muestran que los materiales de obturación causan inicialmente inflamación y se vuelven más biocompatibles con el envejecimiento, como resultado del trauma quirúrgico y también a la liberación de sustancias antigénicas de estos materiales¹²⁷.

¹²³ OSORIO RM, HEFTI A, VERTUCCI FJ, SHAWLEY AL. Cytotoxicity of endodontic materials. En: J Endod. Febrero 1998.vol 24, N°2, p 91-6.

¹²⁴ TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Op cit. p 349-53.

¹²⁵ OSORIO RM, HEFTI A, VERTUCCI FJ, SHAWLEY AL. Op cit., 91-6.

¹²⁶ TORABINEJAD M, FORD TR, ABEDI HR, KARIYAWASAM SP, TANG HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. En: J Endod. Julio 1998.vol 24, N°7, p 468-71.

¹²⁷ Ibid., p 468-71.

En un estudio realizado por Torabinejad y colaboradores en 1998, examinaron la reacción ósea ante la implantación del MTA, amalgama, IRM y Súper EBA en tibias y mandíbulas de cobayos; el MTA presentó la respuesta histológica más favorable. Ellos afirman que la ausencia de inflamación, junto con la gran incidencia de formación de tejido duro alrededor de los implantes con MTA, evidencian la biocompatibilidad del mismo y corroboran los resultados de investigaciones previas sobre el MTA, cuando es utilizado como material de obturación a retro, y como material para recubrimiento pulpar directo¹²⁸.

De acuerdo con Lee y colaboradores 1993, los componentes principales presentes en el MTA son silicato tricálcico, aluminio tricálcico, óxido tricálcico, y óxido de silicato. Además de los trióxidos, hay algunos otros óxidos minerales que son responsables de las propiedades químicas y físicas de este agregado mineral. Así, el MTA no tiene hidróxido de calcio, pero contiene óxido de calcio que al reaccionar con los fluidos tisulares puede formar hidróxido de calcio, in situ¹²⁹.

Es posible que el mecanismo de acción del MTA, por el cual estimula la deposición de tejido duro, tenga alguna similitud con el del hidróxido de calcio. Es necesario continuar con las investigaciones para confirmar los datos observados¹³⁰.

Mutagenicidad. Un material ideal de obturación apical debe ser dimensionalmente estable, y no mutagénico. Kettering y Torabinejad en 1995, realizaron un estudio para evaluar el potencial mutagénico de el IRM, Súper EBA y MTA utilizando la Prueba de Ames. Los resultados demuestran que el MTA, IRM y Súper EBA, no son mutagénico, según lo observado en esta prueba¹³¹.

¹²⁸ Ibid., p 468-72.

¹²⁹ LEE SJ, MONSEF M, TORABINEJAD M. Op cit. p 541-4.

¹³⁰ HOLLAND R, DE SOUZA V, NERY MJ, OTOBONI FILHO JA, BERNABE PF, DEZAN JUNIOR E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. En: J Endod. Marzo 1999.vol 25, N ° 3, p 161-6.

¹³¹ KETTERING JD, TORABINEJAD M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. En: J Endod. Noviembre 1995.vol 21, N°11, p 537-42.

Actividad antibacteriana. Un material ideal de retro obturación, debe producir un completo sellado apical, no ser tóxico, ser bien tolerado por los tejidos, no reabsorbible, estable dimensionalmente, fácil de manipular, y radiopaco. Adicionalmente, deben proporcionar efecto bactericida ó bacteriostático¹³².

Torabinejad y colaboradores en 1995 realizaron un estudio donde toman muestras de las especies bacterianas encontradas en el estudio anteriormente referido, y comparan los efectos antibacterianos de cuatro materiales de obturación a retro apical: la amalgama, el óxido de Zinc-eugenol, el Súper EBA y el Agregado Trióxido Mineral (MTA). Ni el MTA ni ninguno de los cementos estudiados tienen actividad antimicrobiana sobre alguno de los microorganismos anaerobios estrictos de este estudio, pero el MTA sí puede causar algunos efectos en 5 de las 9 bacterias facultativas incluidas en esta investigación; se atribuye este efecto a su elevado pH, o a la liberación o difusibilidad de sustancias en el medio de crecimiento bacteriano¹³³.

Manipulación. Torabinejad y Chivian en 1999, en un trabajo referente a las aplicaciones clínicas del Mineral Trióxido Agregado (MTA), describen la manipulación del mismo, la cual se expone a continuación:

El MTA se debe preparar inmediatamente antes de utilizar. El polvo del MTA, viene en sobres herméticamente sellados; luego de abrir, éstos deben guardarse en recipientes con tapas de cierre hermético, que lo protejan de la humedad. La mezcla del polvo se realiza con agua estéril en una proporción de 3:1, en una loseta o papel de mezclado, con una espátula de plástico o de metal. La mezcla se lleva con un transportador de plástico o de metal hasta el sitio de utilización. La humedad excesiva del sitio de obturación se debe secar con gasa o algodón. Cuando la mezcla es muy seca, se agrega más agua, hasta obtener una consistencia pastosa. El MTA requiere humedad para fraguar; al dejar la mezcla

¹³² TORABINEJAD M, RASTEGAR AF, KETTERING JD, PITT FORD TR. Op cit. p 109-12.

¹³³ Ibid., p 109-12.

en la loseta o en el papel de mezclado se origina la deshidratación del material adquiriendo una contextura seca¹³⁴.

Lee y colaboradores en 1993, en un estudio *in vitro*, evalúan la Microfiltración de la amalgama, IRM y MTA, cuando se utilizan para sellar perforaciones. El MTA se lleva con una pistola tipo "Messing" y se compacta con una torunda de algodón. Los resultados demuestran que el MTA tiene significativamente la menor filtración. Al parecer, el MTA no tiene que compactarse tan firmemente, para lograr una adecuada adaptación a la superficie del diente¹³⁵.

Sluyk y colaboradores 1998, investigaron *in vitro*, las propiedades y características de retención del MTA, cuando es utilizado como material de reparación de perforaciones en la furca de los molares extraídos humanos. El tiempo de trabajo es de 4 minutos, ya que el material comienza a deshidratarse. Al colocar el MTA en la perforación, éste absorbe la humedad de la zona, manteniendo una consistencia pastosa. Esto mejora la fluidez, las características de humectación del material y su mejor adaptación a las paredes dentinarias. Los materiales de reparación disponibles en la actualidad, requieren utilizarse únicamente en campos secos¹³⁶.

Arens y Torabinejad en 1996, recomiendan que en la reparación de perforaciones en la furca, al colocar el MTA directamente sobre la perforación y si es muy amplia, recomiendan colocarlo con una presión mínima. Se cubre el MTA con una torunda de algodón húmeda de 1 a 3 días, para contribuir al fraguado¹³⁷.

Por otra parte, Sluyk y colaboradores 1998, estudian el MTA en perforaciones de la furca y evalúan las diversas condiciones de sellado coronario, colocando una

¹³⁴ TORABINEJAD M, CHIVIAN N. Op cit., p 197-205.

¹³⁵ LEE SJ, MONSEF M, TORABINEJAD M. Op cit., 541-4.

¹³⁶ SLUYK SR, MOON PC, HARTWELL GR. Op cit., 768-71.

¹³⁷ ARENS DE, TORABINEJAD M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Julio 1996.vol 82, N°1, p 84-8.

torunda de algodón húmeda o seca. Los resultados no muestran diferencias significativas con relación a la resistencia al desalojo. Una posible explicación es, que la humedad de la zona es adecuada para mantener la necesidad hidrofílicas del polvo y la condición de la torunda en la cámara pulpar sólo origina una pequeña diferencia, observada y no estadísticamente significativa¹³⁸.

Pitt Ford y colaboradores en 1995 recomiendan que al sellar las perforaciones en la furca, se obture por completo el acceso de la cavidad con MTA y que la restauración definitiva se puede colocar de 1 a 7 días¹³⁹.

A diferencia del estudio anterior, Sluyk y colaboradores 1998, demuestran que a las 72 horas, el MTA resiste un desplazamiento al desalojo significativamente mayor, que a las 24 horas. Recomiendan que después de colocar el MTA, sea protegido con un Material de Restauración Intermedia, de fraguado rápido y dejarlo por 3 días sin tocar¹⁴⁰.

Como el MTA fragua en presencia de humedad, la sangre no afecta su habilidad de sellado. Por esta razón no es necesario colocar una barrera, como se utiliza en los otros materiales de obturación, empleados con la misma finalidad¹⁴¹.

El MTA, por su composición química, puede provocar decoloración de la estructura dentaria, por lo que se recomienda que sea utilizado en el espacio del conducto radicular y cámara pulpar que se encuentra apicalmente a la línea gingival o cresta ósea. (Instructivo ProRoot™ MTA, DENTSPLY Tulsa Dental, Ok).

¹³⁸ SLUYK SR, MOON PC, HARTWELL GR. Op cit., p 768-71.

¹³⁹ FORD TR, TORABINEJAD M, MCKENDRY DJ, HONG CU, KARIYAWASAM SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Junio 1995.vol 79, N°6, p 756-63.

¹⁴⁰ TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Op cit., 349-53.

¹⁴¹ ARENS DE, TORABINEJAD M. Op cit., p 84-8.

La casa fabricante (Dentsply Tulsa Dental) señala ciertas precauciones en la utilización de este material, donde indica evitar el contacto directo del polvo húmedo o seco del MTA, con los ojos, piel, mucosas, (evitar la inhalación e ingestión), ya que se puede producir irritación o inflamación del área expuesta. (Instructivo ProRoot™ MTA, DENTSPLY Tulsa Dental, Ok).

Mecanismo de acción. Los iones de calcio y fosforo son los principales componentes de los tejidos dentales y a la vez son los iones principales que libera el MTA. El oxido de calcio del polvo del MTA con el agua se convierte en hidróxido de calcio. Este a su vez en contacto con los fluidos tisulares se disocia en iones de calcio y en hidroxilo. Al utilizar el MTA o el hidróxido de calcio, el PH tisular local se eleva debido a la solución saturada de iones de hidroxilo. Para reequilibrar el PH, los iones de bicarbonato, el dióxido de carbono, el ácido carbónico presentes en el medio tisular reaccionan con los iones de hidroxilo aumentando considerablemente la concentración de iones de carbonato. Estos a su vez reaccionan con los iones de calcio en solución formando en el tejido granulación carbonato de calcio bajo la forma de calcita¹⁴².

La fibronectina de los tejidos presenta gran afinidad por las granulaciones de carbonato de calcio, que se manifiesta por la alta concentración de fibronectina alrededor de los cristales de calcita. La fibronectina pertenece a un grupo de moléculas de adhesión de sustrato, responsables por la migración, adhesión y diferenciación celular. La producen los fibroblastos, los macrófagos y las células endoteliales. Así la fibronectina sería la responsable por la migración y por la adhesión de células pulpares y periodontales que sintetizan y depositan colágeno formando una matriz orgánica extracelular. También inducen la diferenciación de

¹⁴² PARIROKH M, TORABINEJAD M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. En: J Endod. Marzo 2010.vol 36, N3, p 400-13.

las células pulpaes en odontoblastos o las células del periodonto en cementoblastos, dando lugar a la formación de un puente de tejido duro¹⁴³.

Necrosis superficial tisular. La fase líquida de iones de hidroxilo parece ser responsable por la ligera capa de necrosis pulpar superficial situado entre el puente de tejido mineralizado y el material. En la mayor parte de las veces esta necrosis superficial está ausente y cuando se presenta es mucho más delgada que la se observa con el hidróxido de calcio puro. Gracias a la liberación de fosfato de calcio y Oxido de calcio se ha indicado su uso para inducir la formación de puente dentinario en casos de recubrimiento pulpar directo y de una barrera mineralizada similar a cemento en casos de perforaciones radiculares y apexificaciones. Algunos autores lo han considerado como el material ideal para “Sellar las vías de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y las superficies externas del diente” gracias a sus propiedades biológicas¹⁴⁴.

¹⁴³ Ibid., p 400-13.

¹⁴⁴ Ibid., p 400-14.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad antimicrobiana de la mezcla del MTA con Hipoclorito de sodio y Clorhexidina contra el *Enterococcus faecalis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la susceptibilidad de una cepa de laboratorio de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ante las mezclas de hipoclorito de sodio y clorhexidina
- Determinar la susceptibilidad de las cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* y spp ante las mezclas de hipoclorito de sodio y clorhexidina
- Determinar la concentración de uso clínico de hipoclorito de sodio al 2,25 % y 5,25 % con la cual se logra mayor efecto antimicrobiano para el *enterococcus faecalis*
- Determinar la concentración de uso clínico de Clorhexidina al 0.2 % y 2 % con la cual se logra mayor efecto antimicrobiano para el *enterococcus faecalis*.

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se diseñó un estudio de tipo experimental *in vitro*.

4.2 MUESTRA

Las muestras para la realización de la investigación fueron:

Una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y 8 cepas de aislamientos clínicos: 4 *Enterococcus faecalis* y 4 *Enterococcus spp* obtenidas de pacientes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena con diagnóstico de periodontitis apical crónica, facilitadas por el grupo de investigación GITOUC Mineral Trióxido Agregado (MTA) Pro ROOT (Dentsply/Tulsa Dental, Johnson City, TN) Hipoclorito de sodio (NaOCL) al 2.5% y 5.25% de Laboratorio MOL LABS Químico métricas, Colombia, Clorhexol solución al 0.2% de Laboratorios Farpag, Colombia Clorhexidina FGM - Dental Products Ltd., Joinville, SC, Brazil.

4.3 VARIABLES

Las variables evaluadas para este experimento fueron:

VARIABLES	DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
SUSCEPTIBILIDAD	ES LA PÉRDIDA IRREVERSIBLE DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA REPRODUCIRSE (CRECER Y DIVIDIRSE)	CUANTITATIVA	RAZÓN	Mm
CONCENTRACION DE HIPOCLORITO (NaOCL)	ES LA PROPORCIÓN O RELACIÓN QUE HAY DE NaOCL Y LA CANTIDAD DE SOLVENTE	CUALITATIVA	NOMINAL	%
CONCENTRACION DE CLORHEXIDINA (CHX)	ES LA PROPORCIÓN O RELACIÓN QUE HAY DE CHX Y LA CANTIDAD DE SOLVENTE	CUALITATIVA	NOMINAL	%

4.4. PROCEDIMIENTO

4.4.1 Grupos experimentales o tratamientos. Los grupos experimentales consistieron en cinco mezclas de MTA con Hipoclorito de Sodio (NaOCL) y Clorhexidina (CHX) a diferentes concentraciones siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Para el grupo control se utilizó 1 gr de MTA Pro ROOT con 0.35 ml del agua estéril. Los otros grupos experimentales fueron preparados sustituyendo el agua estéril por 0.35ml de la solución objeto del estudio. Como se indica en la tabla 1.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el presente estudio

	Tratamiento control	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
MTA 1 gr	SOLUCIÓN SALINA 0.35 ml	0.2%CHX 0.35 ml	2%CHX 0.35 ml	2.5%NaOCL 0.35 ml	5.25%NaOCL 0.35 ml

4.4.2 Estandarización del método. El método utilizado fue el de difusión en Agar similar a la técnica reportada por Zarrabi y cols, 2009 con algunas modificaciones.

Un cultivo de 24h de *E faecalis* ATCC 29212 fue diluido para obtener una suspensión bacteriana de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por ml (equivalente a escala 0.5 de McFarland). Luego se procedió a una siembra masiva en Agar nutritivo (Merck, Germany) con hisopo de algodón estéril rotando la placa 60° tres veces con el fin de garantizar que no quedaran espacios entre las siembras que dificultaran la formación de un halo de inhibición. En el estudio de Zarrabi se empleó agar Muller-Hinton, para ese experimento utilizamos el agar Nutritivo porque es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a

requerimientos nutritivos y el *Enterococcus faecalis* presenta un excelente crecimiento en este medio.

Una vez sembrada la placa con *E faecalis* ATCC 29212, se le realizaron 5 pozos con un porta amalgama metálico cuyo diámetro y profundidad era de 4 milímetros. (Anexo 1). Permitiendo que cada muestra evaluada se repitiera por quintuplicado. El bloque de Agar fue retirado inmediatamente por aspiración utilizando una bomba de vacío.

Las mezclas frescas de MTA para los diferentes grupos experimentales fueron colocadas dentro de cada pozo con un porta amalgama y luego de 15 minutos fueron incubadas a 37° C por 24 horas.

Después de 24 horas de incubación se midieron los halos de inhibición en milímetros (mm) con un instrumento de 0.05 mm de precisión.

Posteriormente los datos fueron registrados en el instrumento tal como se muestra a continuación.

4.4.3 Prueba experimental. Una vez estandarizado el método con la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, se determinó la susceptibilidad de 4 aislamientos clínicos de *E. faecalis* y 4 *Enterococcus spp* frente a los diferentes grupos experimentales.

4.4.4. Análisis estadístico. Para la validación de los resultados se aplicó la prueba de ANDERSON DARLING, confirmando que los datos siguen una distribución normal, que existe homogeneidad e independencia entre ellos.

Para el análisis de la información se tomaron los promedios de las medidas de los cinco halos de inhibición de cada grupo experimental y cada una de las cepas tratadas. Se aplicó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de TURKEY para comparar el efecto inhibitorio de las diferentes sustancias irrigadoras y sus concentraciones, con una significancia estadística de $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

Los promedios de halos de inhibición observados en las muestras del presente estudio para los cinco tratamientos evaluadas, teniendo en cuenta la cepa de laboratorio ATCC 29212 y las cepas clínicas se muestran en las tablas 1 y 3, respectivamente. El análisis para la cepa de laboratorio de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales con un valor de $P < 0.0001$.

Tabla 1. Resumen promedios halos de inhibición cepa de laboratorio ATCC 29212

Tratamientos	*NaCL	†CHX 0.2%	‡CHX 2%	¶ NaOCL 2.5%	¨NaOCL5.25%
Promedios halos de inhibición (mm)	4.5	10.6	11.6	11.4	15.5
Valor de $P=0.0001$					

*NaCL: Cloruro de sodio. †CHX 0.2% Clorhexidina al 0.2% ‡ CHX 2% Clorhexidina al 2% ¶ NaOCL 2.5% Hipoclorito de sodio al 2.5% ¨NaOCL 5.25% Hipoclorito de sodio al 5.25%

La tabla 2 muestra los valores obtenidos con el tratamiento NaOCL al 5.25%, el cual produjo un efecto de inhibición mayor al compararlo individualmente con los otros tratamientos (NaCL; $P = 0.000$; CHX 0.2%; $P=0.001$; CHX 2%; $P=0.010$; NaOCL 2.5%; $P=0.007$). Además, a través del test de Dunnett se comparan todas las mezclas con el tratamiento control, observándose diferencias estadísticamente significativas en todos los casos.

Tabla 2. Análisis estadístico comparativo de los tratamientos en la cepa de laboratorio ATCC29212

	Factor 1	Factor 2	Diferencia de Medias Factor(1-2)	Error Típico	Valor de P
Test de Turkey	NaOCl 5.25%	NaCL	11,07333	1,19469	0,000
		CHX 0,2%	4,90000	1,03463	0,001
		CHX 2%	3,96000	1,03463	0,010
		NaOCL 2,5%	4,10000	1,03463	0,007
Test de Dunnett	CHX 0.2%	NaCL	6,17333	1,19469	0,000
	CHX 2%	NaCL	7,11333	1,19469	0,000
	NaOCl 2.5%	NaCL	6,97333	1,19469	0,000
	NaOCl 5.25%	NaCL	11,07333	1,19469	0,000

NaCL: Cloruro de sodio. CHX 0.2% Clorhexidina al 0.2% CHX 2% Clorhexidina al 2% NaOCL 2.5% Hipoclorito de sodio al 2.5% NaOCL 5.25% Hipoclorito de sodio al 5.25%

La tabla 3 muestra la comparación de los diferentes tratamientos entre sí y confirma que existe diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos (valor $P=0.0001$).

Tabla 3. Resumen halos de inhibición de cepas clínicas

Tratamientos					
Promedios halos de Inhibición	NaCL	0.2% CHX	2% CHX	2.5% NaOCL	5.25% NaOCL
E. Faecalis/E. spp	6.14	9.28	12.08	9.16	11.39
Valor de P	0.0001				

NaCL: Cloruro de sodio, CHX 0.2%: Clorhexidina al 0.2%, CHX 2%: Clorhexidina al 2%, NaOCL 2.5%: Hipoclorito de sodio al 2.5%, NaOCL 5.25%: Hipoclorito de sodio al 5.25%.

En la tabla 4 se evidencia que la mezcla de CHX al 2 % presentó mayores valores en el diámetro del halo de inhibición, seguida por la mezcla de NaOCL al 5.25%, mientras que las mezclas de CHX al 0.2 % y de NaOCL al 2.5 % muestran valores similares, siendo los más bajos (NaCL; $P=$ NaOCL 2.5%; $P= 0.000$; CHX 0.2%; $P=0.000$; NaCL 5.25%; $P= 0.106$).

Tabla 4. Análisis estadístico comparativo de los tratamientos en las cepas clínicas

Test de Turkey	Factor 1	Factor 2	Diferencia de Medias(Factor 1 -2)	Error Típico	Valor de P
	CHX 2%		NaCL	7.19250	0,76442
		CHX 0,2%	4.04750	0,76442	0,000
		NaOCL 2.5 %	4.16000	0,76442	0,000
		NaOCl 5,25%	1.93625	0,76442	0,106
Test de Dunnett	CHX 0,2%	NaCL	3,14500	0,76442	0,001
	CHX 2%	NaCL	7,19250	0,76442	0,000
	NaOCL2,5%	NaCL	3,03250	0,76442	0,001
	NaOCL 5,25%	NaCL	5,25625	0,76442	0,000

NaCL: Cloruro de sodio, CHX 02%: Clorhexidina al 0.2%, CHX 2%: Clorhexidina al 2%, NaOCL 2.5%: Hipoclorito de Sodio al 2.5%, NaOCL 5.25%: Hipoclorito de sodio al 5.25%.

Las medias de los valores de los halos de inhibición obtenidos al combinar las cepas de laboratorio y las cepas clínicas, así como los máximos y mínimos de cada grupo y su desviación estándar se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Tabla de Análisis Estadístico

	NaCL	CHX 0.2%	CHX 2%	NaOCL 2.5%	NaOCL 5.25%
PROMEDIO HALO DE INHIBICIÓN	5.95	9.44	13.14	9.43	11.9
MEDIA	5,95	9,44	13,14	9,43	11,9
ERROR TÍPICO	0,41	0,76	0,34	0,52	0,6
MEDIANA	5,82	8,42	12,82	9,66	11,52
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1,22	2,28	1,00	1,5	1,8
VARIANZA DE LA MUESTRA	1,5	5,21	1,01	2,4	3,4
CURTOSIS	-1,5	-1,3	0,9	-1,6	0,7
COEFICIENTE DE ASIMETRÍA	0,3	0,5	0,6	-0,3	1,0
RANGO	3,2	6,04	3,48	4	5,7
MÍNIMO	4,46	7,14	11,58	7,44	9,84
MÁXIMO	7,72	13,18	15,06	11,44	15,54
SUMA	53,6	84,92	118,24	84,82	106,71
CUENTA	9	9	9	9	9
VALOR DE P	0.0001				

NaCL: Cloruro de sodio, CHX 0.2%: Clorhexidina al 0.2%, CHX 2%: Clorhexidina al 2%, NaOCL 2.5%: Hipoclorito de sodio al 2.5%, NaOCL 5.25%: Hipoclorito de sodio al 5.25%.

6. DISCUSIÓN

Para este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana del MTA como material obturador de conductos radiculares en apexificaciones y cavidades de retro obturación apical. El MTA se mezcló con solución salina y con otras sustancias irrigadoras de conocido efecto antimicrobiano en pacientes que asistieron a consulta para tratamiento endodóntico con diagnóstico de Periodontitis apical. Se procedió a investigar la actividad antimicrobiana del MTA mezclado con solución salina, Clorhexidina al 0.2% y 2% e Hipoclorito de sodio al 5.25% y 2.5% contra una cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 y 8 cepas de aislamientos clínicos: 4 *E. faecalis* y 4 *Enterococcus spp* obtenidas de pacientes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena.

Se trabajó inicialmente con una cepa certificada por la ATCC, la cual fue de gran utilidad ya que con ella se pudo estandarizar el método y obtener resultados iniciales que determinaron el comportamiento *in vitro* de los tratamientos, pero a diferencia de otros trabajos de investigación como el de Parirokh y Zarrabi en el 2009^{145,146}, fue necesario realizar ensayos con cepas de aislamiento clínico debido a que estas muestran el efecto de los tratamientos contra las bacterias en un ambiente específico como lo es la cavidad oral en la clínica odontológica. En este sentido, es justificable este diseño debido a que la eliminación completa de los microorganismos en dientes con patología apical es el objetivo primordial de la Endodoncia, identificándose al *E. faecalis* como el microorganismo más

¹⁴⁵ PARIROKH, M y TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. En: J Endod. Marzo 2010.vol 36, N°3, p 400-13.

¹⁴⁶ ZARRABI, M; JAVIDI, M; NADERINASAB, M y GHARECHAHI, M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. En: Journal of Oral Science. Septiembre 2009. Vol 51, N° 3, p 437-442.

predominante en el biofilm periapical, en infecciones apicales refractarias y en fracasos de dientes sometidos a cirugía apical.

Los efectos antimicrobianos del MTA mezclado con CHX e NaOCL han sido reportados en diferentes estudios como el de Kogan en el 2006, Dennis en el 2007 y Giardino en el 2007, nunca se ha realizado un estudio similar en cepas clínicas de nuestra región^{147,148,149}.

Para la realización de la investigación se utilizó el método de Agar difusión que es el más utilizado para determinar actividad antimicrobiana de diversas sustancias. Esta técnica ha sido muy usada para estudios antimicrobianos como lo hicieron Torabinejad M. en 1995 y Zarrabi en 2009, con diferencias en el medio de Agar tales como: la capacidad de difusión de los agentes inhibidores, las cepas bacterianas y la densidad celular.^{150,151} Estas diferencias interfieren en la formación del halo de inhibición alrededor de los materiales empleados para determinar el efecto antimicrobiano, debido a que su pH alcalino (aproximadamente 10 – 12) neutraliza la acidez del medio evitando el desarrollo bacteriano. Los reportes de Sundquist en 1998, Rocas en 2004 y Basrani en 2003 acerca del NaOCl se refieren a la concentración y pH adecuado para la acción bactericida.^{152, 153, 154}

¹⁴⁷ KOGAN, P; HE, J; GLICKMAN, G y WATANABE I. The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. En: Journal of Endodontics. Junio, 2006. Vol 32, N° 6, p 509-72.

¹⁴⁸ HOLT, D; WATTS, D; BEESON,T; KIRKPATRICK, T Y RUTLEDGE, R. The Anti-microbial Effect Against Enterococcus faecalis and the Compressive Strength of Two Types of Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Sterile Water or 2% Chlorhexidine Liquid. En: Journal of Endodontics Julio, 2007. Vol 33, N° 9, p 844-7.

¹⁴⁹ GIARDINO, L; AMBU, E y SAVOLDI, E. et al. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against Enterococcus faecalis Biofilm. En: Julio, 2007. Vol 33, N° 7. p 852-5.

¹⁵⁰ Ibid.

¹⁵¹ SUNDQVIST, G; FIGDOR, D; PERSSON, S y SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Enero 1998. Vol 85, N°1, p 86-93.

¹⁵² Ibid.

¹⁵³ ROCAS, IN; SIQUEIRA, JF y SANTOS, KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. En: J Endod. 2004. Mayo 2004. vol 30, N° 5, p 315-320.

Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento de MTA con NaOCL al 5.25% tuvo una significativa actividad antimicrobiana contra la cepa de laboratorio ATCC29212, en comparación con las otras sustancias. Esto quizá se explica por ser ésta una cepa pura que no ha sufrido mutaciones al no haber tenido simbiosis con otro tipo de microorganismos y a que la concentración al 5.25% de NaOCL fue la máxima concentración empleada y que su difusión en el medio utilizado favoreció más la actividad antimicrobiana a diferencia de las otras sustancias evaluadas. Torabinejad y colaboradores en 1994 observaron un pH inicial de 10.2 para el MTA con un aumento de 12.5 a las 3 horas. Los niveles de pH de alrededor de 12 del MTA pueden inhibir más microorganismos.

Así mismo, este estudio demuestra que la mezcla de MTA con NaOCL al 5.25% tuvo actividad antimicrobiana contra las cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* y *spp* mientras que Estrela y colaboradores en el 2000 no encontraron actividad antimicrobiana con la mezcla de MTA y solución salina.

Estos resultados son similares a los de Dennis M. Holt, en los que se obtuvieron zonas de inhibición significativamente mayores para la mezcla de MTA con 2 % CHX, resultados que podrían estar influidos por la solubilidad y difusibilidad de la mezcla a través del agar. Adicionalmente ambos estudios confirman que la mezcla de MTA con solución salina produjo pequeñas zonas de inhibición lo cual implica que el MTA tiene algunos efectos antimicrobianos y podría atribuirse a un pH elevado de la MTA. Más recientemente Clegg en el 2006 confirma que la clorhexidina si se complementa con algún sistema físico de disrupción del biofilm, los resultados podrían ser parejos a los del hipoclorito.¹⁵⁵ Esta opinión surge de un estudio piloto del autor y se asemeja a lo realizado en el presente estudio, en el

¹⁵⁴ BASRANI, B; TJÄDERHANE,L y SANTOS, JM. Et al. Efficacy of chlorhexidine-and calcium hidroxide – containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. En: Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod. Noviembre 2003.vol 96, N°5, p 618-24.

¹⁵⁵ CLEGG, M; VERTUCCI, F Y WALKER, C. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. Et al. En: Journal of Endodontics. Mayo, 2006. Vol 32, N° 5, p 434-7.

cual la mezcla de MTA con Clorhexidina logra mayores halos de inhibición debido a la sustantividad de la misma sumada al elevado pH del MTA que logran potencializar el efecto antibacteriano de la mezcla.

En este mismo sentido, numerosos estudios coinciden en afirmar que la CHX posee mayor poder de erradicación de *E. faecalis* que el NaOCL como lo demuestran las investigaciones de Portenier en el 2006.¹⁵⁶ Las mezclas de MTA con NaOCL al 2.5% y CHX al 0.2% no mostraron diferencias significativas al igual que el estudio de Kuruvilla en 1998.¹⁵⁷

En la presente investigación se obtuvieron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de las mezclas de MTA con NaOCL al 5.25% y CHX al 2% mientras que otros estudios como el realizado por Jeansonne en 1994, la diferencia no fue estadísticamente significativa con el NaOCl.¹⁵⁸

En este estudio se muestra que el efecto antimicrobiano del MTA se incrementa cuando se mezcla con sustancias de conocido efecto antimicrobiano en cepas clínicas de pacientes de la región. Estos resultados servirían para realizar tratamientos, retratamientos y selle de perforaciones radiculares de mayor calidad, mejorando el pronóstico y lo principal disminuir en lo posible la cirugía apical. Debido a que uno de los principios del tratamiento endodóntico convencional es realizar una completa limpieza o esterilización del sistema de conductos radicular y lograr un selle apical hermético con un material que estaría reuniendo todas los principios del material obturador ideal. Así mismo, en los retratamientos y en el

¹⁵⁶ PORTENIER, I; WALTIMO, T Y ORSTAVIK, D. et al. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. En: Journal of Endodontics. Febrero 2006. Vol 32, N° 2, p 138-41

¹⁵⁷ KURUVILLA, JR y KAMATH, MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. En: J Endod. Julio 1998. Vol 24, N°7, p 472-6.

¹⁵⁸ JEANSONNE, M Y WHITE, R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. En: Journal of Endodontics. Junio 1994. Vol 20, N° 6, p 276-8.

tratamiento de accidentes de la preparación biomecánica como las perforaciones radiculares que exigen un selle totalmente impenetrable al paso de microorganismos se estaría empleando un material obturador con mayores garantías de éxito.

7. CONCLUSIONES

La efectividad antimicrobiana de la mezcla de MTA con Hipoclorito de sodio al 5.25% contra el *Enterococcus faecalis* fue la más eficaz en la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, a diferencia de las cepas clínicas, en donde la mezcla de MTA con Clorhexidina al 2% fue la más eficaz. Con la concentración de hipoclorito de sodio al 5,25 % se logra mayor efecto antimicrobiano para el *enterococcus faecalis* que con la concentración al 2.5%. Con la concentración de Clorhexidina al 2 % se logra mayor efecto antimicrobiano para el *enterococcus faecalis* que con la concentración al 0.2%. Todos los tratamientos fueron superiores a la mezcla de MTA con NaCl. Estos resultados son buenos y ayudan a mejorar los tratamientos en la clínica, pero la microbiología de las patologías apicales crónicas abarca otras especies de microorganismos entre estos, los hongos, que en la actualidad se le atribuyen muchos fracasos endodónticos y de ser responsables en la cronicidad de patologías endodónticas. Por este motivo, recomendamos realizar otras investigaciones en las cuales se evalúen sustancias que sean efectivas contra estos microorganismos.

BIBLIOGRAFIA

ABDULLAH M; NG YL; GULABIVALA K; y MOLES DR. et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. En: Journal of Endodontic. Enero, 2005.vol 31,Nº.1, p 30-6.

ARENS DE, TORABINEJAD M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Julio, 1996.vol 82, Nº1, p 84-8.

AYHAN H; SULTAN N; y CIRAK M. et al. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. En: Int Endod Journal. Marzo, 1999.vol 32, Nº2, p 99-102.

BASRANI B; TJADERHANE L y SANTOS JM. et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Noviembre 2003.vol 96, Nº5, p 618-24.

BATES CF; CARNES DL; y DEL RIO CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. En: J Endod. Noviembre 1996.vol 22, Nº1, p 575-8.

BATES RG; SMITH ER. Standardization of the pH scale. En: J Wash Acad Sci. Febrero1948.vol 38, Nº2, p 61-6.

BAUMGARTNER JC; FALKLER WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. En: Journal of Endodontic. Agosto 1991.vol 17, Nº8, p 380-3.

BAUMGARTNER JC; MADER CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. En: Journal of Endodontic. Abril 1987.vol 13, Nº4, p 147-57.

BUCK RA; ELEAZER PD; y STAAT RH. et al. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. En: Journal of Endodontic. Marzo 2001.vol 27, Nº3, p 206-8.

CHU FC; LEUNG WK; y TSANG PC. Et al. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. En: Journal of Endodontics.Enero 2006.vol 32, Nº1, p 17-23.

CLEGG, M; VERTUCCI, F Y WALKER, C. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. Et al. En: Journal of Endodontics. Mayo, 2006. Vol 32, N° 5, p 434-7.

DAMETTO FR; FERRAZ CC; y GOMES BP. Et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against Enterococcus faecalis. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Junio 2005.vol 99, N°6, p 768-72.

ESTREL, C; BAMMANN, LL y ESTRELA, CR. Et al. Antimicrobials and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. En: Braz Dent J. Febrero 2000. Vol 11, N° 1, p 3-9.

FERGUSON DB; MARLEY JT; y HARTWELL GR. The effect of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: long-term results. En: Journal Endodontics. Febrero 2003.vol 29, N°2, p 91-4.

FISCHER EJ; ARENS DE; y MILLER CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. En: Journal of Endodontics. Marzo 1998.vol 24, N°3, p 176-9.

FORD TR; TORABINEJAD y M; McKendry DJ. Et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Junio 1995.vol 79,N°6, p 756-63.

GARTNER AH; DORN SO. Advances in endodontic surgery. En: Dent Clin North Am. Abril 1992.vol 36, N°2, p 357-78.

GEORGE S; KISHEN A; y SONG KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. En: J Endod. Diciembre 2005.vol 31, N°12, p 867-72.

GIARDINO L; AMBU E; SAVOLDI E. y RIMONDINI R. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against Enterococcus faecalis biofilm. En: J Endod. Julio 2007.vol 33, N°7, p 852-5.

GIARDINO, L; AMBU, E y SAVOLDI, E. et al. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against Enterococcus faecalis Biofilm. En: Journal of Endodontics. Julio, 2007. Vol 33, N° 7, p 852-5.

GOLDMAN LB; GOLDMAN M. y KRONMAN JH. Et al. Adaptation and porosity of poly-HEMA in a model system using two microorganisms. En: J Endod. Agosto 1980.vol 6, N°8, p 683-6.

GOMES BP; FERRAZ CC. y VIANNA ME. Et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. En: Int Endod J. Septiembre 2001.vol 34, N°6, p 424-8.

GOMES BP; SOUZA SF. y FERRAZ CC. Et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. En: Int Endod J. Abril 2003.vol 36, N°4, p 267-75.

GROVE-RASMUSSEN KV. [Standardization of the pH scale; review]. En: Dan Tidsskr Farm. Octubre 1953.vol 27, N°10, p 221-36.

HAUMAN CH; LOVE RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. En: Int Endod J. Febrero 2003.vol36, N°2, p 75-85.

HELING I; CHANDLER NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. En: Int Endod J. Enero 1998.vol 31, N°1, p 8-14.

HOLLAND R; DE SOUZA V; y NERY MJ. Et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. En: J Endod. Marzo 1999.vol 25, N°3, p 161-6.

HOLT, D; WATTS, D; BEESON,T; KIRKPATRICK, T Y RUTLEDGE, R. The Anti-microbial Effect Against Enterococcus faecalis and the Compressive Strength of Two Types of Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Sterile Water or 2% Chlorhexidine Liquid. En: Journal of Endodontics. Julio 2007. Vol 33, N° 9, p 844-7.

HOLT, D; WATTS, J Y BEESON, T. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. En: J Endod. Julio 2007. Vol 33, N° 9, p 844-7.

JEANSONNE, M Y WHITE, R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. En: Journal of Endodontics. Junio1994. Vol 20, N°6, p 276-8.

KAKEHASHI S; STANLEY HR; y FITZGERALD RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol. Septiembre 1965.vol 20, p 340-9.

KAYAOGLU G; ORSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. En: Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(5):308-20.

KETTERING JD; TORABINEJAD M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. En: J Endod. Noviembre 1995.vol 21, N°11, p 537-42.

KOGAN, P; HE, J; GLICKMAN, G y WATANABE I. The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. En: Journal of Endodontics. Junio, 2006. Vol 32, N° 6, p 509-72.

KOH ET; McDonald F; y PITT FORD TR. Et al. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. En: J Endod. Agosto 1998.vol 24, N°8, p 543-7.

KOH ET; TORABINEJAD M; y PITT FORD TR. Et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. En: J Biomed Mater Res. Diciembre 1997.vol 37, N°3, p 432-9.

KURUVILLA JR; KAMATH MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. En: J Endod. 1998 Jul;24(7):472-6.

LEE SJ; MONSEF M; y TORABINEJAD M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. En: J Endod. Noviembre 1993.vol 19, N°11, p 541-4.

LEONARDO MR; TANOMARU FILHO M; y SILVA LA. Et al. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. Marzo 1999.vol 25, N°3, p 167-71.

LIMA KC; FAVA LR; y SIQUEIRA JF, Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. En: J Endod. Octubre 2001.vol 27, N°10, p 616-9.

LIN YH; MICKEL AK; y CHOGLE S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. En: J Endod. Septiembre 2003.vol 29, N°9, p 565-6.

MAKI-PETAYS O; KORKEALA H; y ALANKO T. Et al. Comparison of different pH measurement methods in meat. En: Acta Vet Scand. Enero 1991.vol 32, N°1, p 123-9.

McHugh CP; ZHANG P; y MICHALEK S. Et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. En: J Endod. Abril 2004.vol 30, N°4, p 218-9.

MITCHELL PJ; PITT FORD TR; y TORABINEJAD M. Et al. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. En: Biomaterials. Enero 1999.vol 20, N°2, p 167-73.

NAKATA TT; BAE KS; y BAUMGARTNER JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. En: J Endod. Marzo1998.vol 24, N°3, p 184-6.

OSORIO RM; HEFTI A; y VERTUCCI FJ. Et al. Cytotoxicity of endodontic materials. En: J Endod. Febrero 1998.vol 24, N°2, p 91-6.

PAQUETTE L; LEGNER M; y FILLERY ED. Et al. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. En: J Endod. Julio 2007.vol 33, N°7, p 788-95.

PARIROKH M; TORABINEJAD M; Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. En: J Endod. Marzo 2010.vol 36, N°3, p 400-13.

PORTENIER, I; WALTIMO, T Y ORSTAVIK, D.et al. Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. En: Journal of Endodontics. Febrero 2006. Vol 32, N° 2, p 138-41.

ROCAS, IN; SIQUEIRA, JF y SANTOS, KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. En: J Endod. Mayo 2004. vol 30, N° 5, p 315-320.

SASSONE LM; FIDEL RA; y FAVERI M. Et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. En: J Endod. Mayo 2008. Vol 34, N°5, p 541-5.

SCHAFER E; BOSSMANN K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against Enterococcus faecalis. En: J Endod. Enero 2005.vol 31, N°1, p 3-6.

SEDGLEY C; BUCK G; y APPELBE O. Prevalence of Enterococcus faecalis at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. En: J Endod. Febrero 2006.vo 32, N°2, p 104-9.

SEDGLEY C; NAGEL A.; y DAHLEN G. Et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals. En: J Endod. Marzo 2006.vol 32, N°3, p 173-7.

SENA NT; GOMES BP; y VIANNA ME. Et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. En: Int Endod J. 2006 Nov;39(11):878-85.

SIQUEIRA JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Septiembre 2002.vol 94,Nº3, p 281-93.

SIQUEIRA JF, Jr., ROCAS IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. En: J Endod. Junio 2005.vol 31, Nº6, p 411-23.

SIQUEIRA JF, Jr., ROCAS IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Enero 2004.vol 97, Nº1, p 85-94

SIQUEIRA JF, Jr.; MACHADO AG; y SILVEIRA RM. Et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro. En: Int Endod J. Julio 1997.vol 30, Nº4, p 279-82.

SIQUEIRA JF, Jr.; ROCAS IN; y SANTOS SR. Et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. En: J Endod. Marzo 2002.vol 28, Nº3, p 181-4.

SLUYK SR; MOON PC; y HARTWELL GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. En: J Endod. Noviembre 1998.vol 24, Nº11, p 768-71.

SPRATT DA; PRATTEN J; y WILSON M. Et al. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. En: Int Endod J. Junio 2001.vol 34, Nº4, p 300-7.

STABHOLZ A; FRIEDMAN S; y ABED J. Marginal adaptation of retrograde fillings and its correlation with sealability. En: J Endod. Mayo 1985.vol 11,Nº5, p 218-23.

STUART CH; SCHWARTZ SA; y BEESON TJ. Et al. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. En: J Endod. Febrero 2006.vol 32, Nº2, p 93-8.

SUIDAN JS; YOUNG BK; y HETZEL FW. Et al. pH Measurement with a fiber-optic tissue-pH monitor and a standard blood-pH meter. En: Clin Chem. Agosto 1983.vol 29, Nº8, p 15-66.

SUNDQVIST, G; FIGDOR, D; PERSSON, S y SJÖGREN, U. Microbiologic analisis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodo. Enero 1998. Vol 85, N° 1, p 86-93.

TORABINEJAD M.; CHIVIAN N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. En: J Endod. Marzo 1999.vol 25, N°3, p 197-205.

TORABINEJAD M; FORD TR; y ABEDI HR. Et al. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. En: J Endod. Julio 1998.vol 24, N°7, p 468-71.

TORABINEJAD M; HIGA RK; y McKendry DJ. Et al. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. En: J Endod. Abril 1994.vol 20, N°4, p 159-63.

TORABINEJAD M; HONG CU; y McDonald F. Et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. En: J Endod. Julio 1995.vol 21, N°7, p 349-53.

TORABINEJAD M; PITT FORD TR. Root end filling materials: a review. En: Endod Dent Traumatol. Agosto 1996.vol 12, N°4, p 161-78.

TORABINEJAD M; RASTEGAR AF; y KETTERING JD. Et al. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. En: J Endod. Marzo 1995.vol 21, N°3, p 109-12.

TORABINEJAD M; WATSON TF; y PITT FORD TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. En: J Endod. Diciembre 1993.vol 19, N°12, p 591-5.

TORABINEJAD, M; HIGA, RK; MCKENDRY ,DJ Y PITT FORD, TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. J Endod. Abril 1994. Vol 20, N°4, p 159-63.

TORABINEJAD, M; HONG, CU; MCDONALD, F y PITT FORD, TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. En: J Endod. Julio 1995. vol 21, N°7, p 349-53.

VIANNA ME; GOMES BP; y BERBER VB. Et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Enero 2004.vol 97, N°1, p 79-84.

YANG SE; CHA JH; y KIM ES. Et al. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of Enterococcus faecalis to bovine dentin. En: J Endod. Julio 2006.vol 32, N°7,p 663-7.

YATSUSHIRO JD; BAUMGARTNER JC; y TINKLE JS. Longitudinal study of the microleakage of two root-end filling materials using a fluid conductive system. En: J Endod. Noviembre 1998.vol 24, N°11, p 716-9.

ZARRABI, M; JAVIDI, M; NADERINASAB, M y GHARECHAHI, M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral troxide aggregate (MTA) and Portland. En: Journal of Oral Science. Septiembre 2009. Vol 51, N° 3, p 437-442.

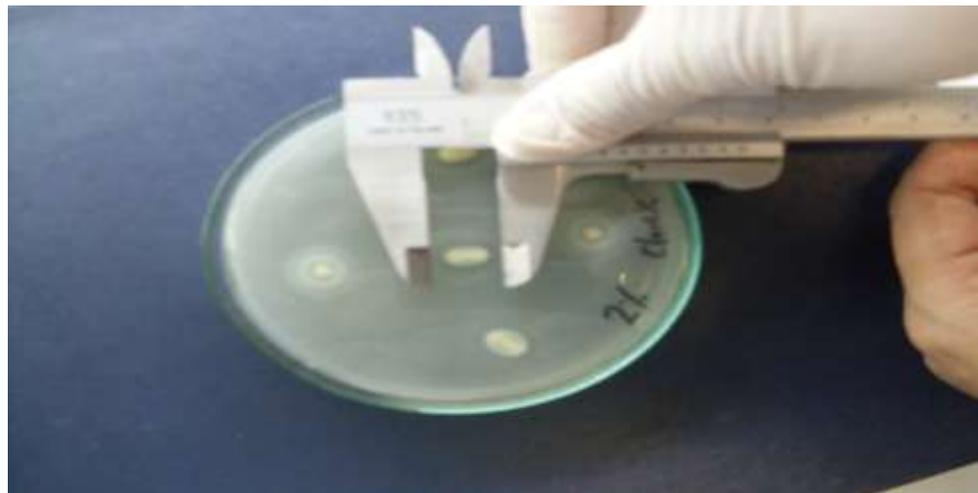
ANEXOS

Anexo 1. IMAGEN DE PLATOS DE CULTIVO



Plato de cultivo de la mezcla de MTA y Clorhexidina al 0.2 % donde se observan los halos de inhibición

Anexo 2. IMAGEN DE MEDICIÓN DE PLATOS DE CULTIVO



Medición de halos de inhibición con regla mm de precisión

Anexo 3. IMAGEN DE APLICACIÓN DEL MTA EN PLATOS DE CULTIVO



Porta amalgama que contiene mezcla de MTA y es empacado en pozos de los platos de cultivos

Anexo 4.

INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA EFECTIVIDAD DE LA MEZCLA DEL MTA CON HIPOCLORITO DE SODIO Y CLORHEXIDINA EN CONTACTO CON *Enterococcus faecalis*

INSTRUMENTO

	HALOS DE INHIBICION MILÍMETROS (mm)				
GRUPO EXPERIMENTAL / BACTERIA	GRUPO CONTROL	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
ATCC 29212					
<i>E faecalis</i> P02*					
<i>E faecalis</i> P03					
<i>E faecalis</i> P03*					
<i>E faecalis</i> P20					
<i>Enterococcus</i> spp P30					
<i>Enterococcus</i> spp P50					
<i>Enterococcus</i> spp P05					
<i>Enterococcus</i> spp P02					

Anexo 5.
INSTRUCTIVO

1. Un cultivo de *E faecalis* ATCC 29212 se diluyó para obtener una suspensión bacteriana de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por ml (equivalente a 0.5 en la escala de McFarland)
2. Luego se sembró en Agar nutritivo con hisopo de algodón estéril.
3. Una vez sembrada la placa con *E faecalis* ATCC 29212, se le realizaron 5 pozos con un porta amalgama
4. El bloque de Agar se retiró por aspiración con una bomba de vacío.
5. Se prepararon las mezclas de MTA para los diferentes grupos experimentales y fueron colocadas dentro de cada pozo con un porta amalgama.
- 6, Luego de 15 minutos fueron incubadas a 37° C por 24 horas.
7. Después de 24 horas de incubación se midieron los halos de inhibición en milímetros (mm) con un instrumento de 0.05 mm de precisión.
8. Por último se registraron los promedios de cada placa en el instrumento.

TABLAS

Promedios de halos de mm cepa de laboratorio

NaCl	0,2% Clorexin	2% clorexin	2,5% NaOCl	5,25% NaOCl
4,8	10,6	13,1	9,6	13,8
4,4	11	12,7	9,8	12,5
4,2	11	10,6	10,1	16,5
	10,5	11,2	13,8	18,2
	10,1	10,3	13,9	16,7

Promedios de halos de inhibición en mm de cepas clínicas

CEPA	NaCl	0,2% Clorexin	2% clorexin	2,5% NaOCl	5,25% NaOCl
REF	4,47	10,64	11,58	11,44	15,54
P02*	5,08	7,22	12,8	7,44	10,06
P03	5,82	8,32	14,2	9,56	10,62
P03*	6,26	13,18	15,06	9,86	11,65
P20	7,72	8,42	12,42	10,78	13,9
P30	6,88	10,62	12,82	7,64	11,52
P50	4,7	7,14	13,34	10,98	12,32
P05	7,54	12,16	13,2	9,66	11,26
P02	5,12	7,22	12,82	7,46	9,84

REF: Enterococcus faecalis ATCC29212; P02*, P03, P03*, P20: Enterococcus faecalis; P30, P50, P05, P02: Enterococcus spp.

Análisis estadístico

	NaCl	CHX 0.2%	CHX 2%	NaOCL 2.5%	NaOCL 5.25%
PROMEDIO HALO DE INHIBICIÓN	5.95	9.44	13.14	9.43	11.9
MEDIA	5,95	9,44	13,14	9,43	11,9
ERROR TÍPICO	0,41	0,76	0,34	0,52	0,6
MEDIANA	5,82	8,42	12,82	9,66	11,52
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1,22	2,28	1,00	1,5	1,8
VARIANZA DE LA MUESTRA	1,5	5,21	1,01	2,4	3,4
CURTOSIS	-1,5	-1,3	0,9	-1,6	0,7
COEFICIENTE DE ASIMETRÍA	0,3	0,5	0,6	-0,3	1,0
RANGO	3,2	6,04	3,48	4	5,7
MÍNIMO	4,46	7,14	11,58	7,44	9,84
MÁXIMO	7,72	13,18	15,06	11,44	15,54
SUMA	53,6	84,92	118,24	84,82	106,71
CUENTA	9	9	9	9	9
VALOR DE P	0.0001				

CUADROS

Grafico de Variables

VARIABLES	DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
SUSCEPTIBILIDAD	ES LA PÉRDIDA IRREVERSIBLE DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA REPRODUCIRSE (CRECER Y DIVIDIRSE)	CUANTITATIVA	NOMINAL	mm
CONCENTRACION DE HIPOCLORITO (NaOCL)	ES LA PROPORCIÓN O RELACIÓN QUE HAY DE NaOCL Y LA CANTIDAD DE SOLVENTE	CUANTITATIVA	NOMINAL	%
CONCENTRACION DE CLORHEXIDINA (CHX)	ES LA PROPORCIÓN O RELACIÓN QUE HAY DE CHX Y LA CANTIDAD DE SOLVENTE	CUANTITATIVA	NOMINAL	%

Cuadro de tratamientos

	Tratamiento control	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
MTA 1 gr	SOLUCIÓN SALINA 0.35 ml	0.2%CHX 0.35 ml	2%CHX 0.35 ml	2.5%NaOCL 0.35 ml	5.25%NaOCL 0.35 ml