

**DETERMINACION “*INVITRO*” DEL EFECTO BACTERICIDA DE LAS
PUNTAS DE GUTAPERCHA CON HIDRÓXIDO DE CALCIO (PLUS POINT
®) SOBRE CEPAS DE *Enterococcus faecalis* Y *Fusobacterium nucleatum***

Tesis presentada por:

CLAUDIA MARÍA HERRERA FUENTES

Ante el Tribunal de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de
Guatemala que practico el Examen General Público previo a optar al título de:

CIRUJANA DENTISTA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2007

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

Decano:	Dr. Eduardo Abril Gálvez
Vocal Primero:	Dr. Sergio Armando García Piloña
Vocal Segundo:	Dr. Juan Ignacio Asensio Anzueto
Vocal tercero:	Dr. César Mendizábal Girón
Vocal cuarto:	Br. Andrea Renata Samayoa Guzmán
Vocal quinto:	Br. Aldo Isaías López Godoy
Secretaria Académica:	Dra. Cándida Luz Franco Lemus

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PÚBLICO

Decano:	Dr. Eduardo Abril Gálvez
Vocal primero:	Dr. Sergio Armando García Piloña
Vocal segundo:	Dr. Werner Edgardo Florián Jeréz
Vocal tercero:	Dr. Edwin Ernesto Milián Rojas
Secretaria Académica:	Dra. Cándida Luz Franco Lemus

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Tú que eres la razón de mi vida, gracias a tí he logrado alcanzar una de mis metas.

A MIS PADRES:

Edgar Herrera y Clara Luz Fuentes por su amor, comprensión y el apoyo incondicional que siempre he recibido de ellos.

A MIS HERMANOS:

Erwin, Carmen y Benjamín. Gracias por sus consejos y por permanecer siempre a mi lado. Que Dios les bendiga por siempre.

EN MEMORIA DE MIS ABUELITOS:

José Benjamín Herrera, Jorge Fuentes, María Salomé Herrera y Lidia Elubia Ríos. A quienes recuerdo con cariño. Por siempre vivirán en mi corazón.

A MIS TÍOS:

Fernando Fuentes y Thelma Fuentes, por ser tan especiales conmigo.

A MIS AMIGOS:

Elsi, Virginia, Geny, Albita, Edna, Nancy, Claudia, Ludwing, Antonio Palacios, Marvin Escalante, Tito, Mario Córdón, Sergio Guillén, Renato Figueroa, Caguar, Henry Cheesman. Con mucho cariño.

A MIS CATEDRÁTICOS:

Porque de ustedes he adquirido todos los conocimientos prácticos y teóricos que serán el preámbulo en mi desempeño profesional

A CUATRO PERSONAS ESPECIALES:

Rosa Consuelo Gamas, Arnoldo Antonio Guillén, María Isabel Aguilar y Gilberto de Jesús Sánchez a quienes respeto y quiero muchísimo. Gracias por sus consejos.

TESIS QUE DEDICO

A Dios: Porque tú me enseñaste a luchar por lo que quiero. A ti debo mis logros.

A mi familia: por ser las personas más importantes de mi vida.

A mis Padrinos: Dr. José Guillermo Carrillo Paredes, Lic. Marvin Ferneli Escalante Díaz, Dr. Antonio Isaías Palacios López y Dra. Elsi Merari Bernal Nájera. A quienes admiro y respeto. Porque son seres extraordinarios y dignos de llamarse profesionales.

A mis Asesores: Dr. José Guillermo Carrillo Paredes, Dr. Werner Edgardo Florián Jeréz y Dr. Edwin Ernesto Milián Rojas. Gracias por su ayuda y dedicación para la realización de esta tesis.

Al IGGS de Accidentes: Gracias por permitir la realización del trabajo de campo de mi tesis en el Laboratorio Bacteriológico.

A Lic. Aída Cifuentes: Por brindarme su apoyo incondicional al permitir la realización de mi trabajo de campo en las instalaciones del IGGS de Accidentes. Gracias.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Tengo el honor de someter a su consideración mi trabajo de tesis intitulado: “Determinación “*in vitro*” del efecto bactericida de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio (plus point ®) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*,” conforme lo demandan los Estatutos de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, previo a optar al título de:

CIRUJANA DENTISTA

Expreso mi agradecimiento a mis asesores: Dr. Edwin Ernesto Milián Rojas, Dr. Werner Edgardo Florián Jeréz y Dr. José Guillermo Carrillo Paredes por su valiosa colaboración en este trabajo. Considero oportuno agradecer la buena disposición de la Dra. Aída Cifuentes Sosa, Jefa de Laboratorio Clínico del IGSS.

Ustedes distinguidos miembros del Tribunal Examinador, sírvanse aceptar las muestras de mi mas alta consideración y respeto.

SUMARIO

La presente investigación se llevó a cabo con el propósito de evaluar la efectividad bactericida “*in vitro*” de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio (Plus Point®) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Se realizó la siembra de *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922) sobre agar sangre de carnero al 5% y la siembra de *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) en agar chocolate. Se incubaron por 24 y 72 horas respectivamente a una temperatura de 35°C. Luego se observó si hubo crecimiento de estas cepas bacterianas y con el turbidímetro se procedió a medir la concentración de bacterias en un tubo conteniendo agua destilada siendo las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0. Luego se procedió a realizar la siembra de las distintas concentraciones de bacterias sobre agar Müeller Hinton para el *Enterococcus faecalis* y agar chocolate para *Fusobacterium nucleatum* en los cuales se colocaron las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio con sus distintos calibres (15, 20, 25, 30, 35, 40). Se dejaron en la incubadora por 24 horas para la primera bacteria y 72 horas para la segunda.

De los resultados que se obtuvieron luego de la incubación, hubo crecimiento de colonias bacterianas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* alrededor de las puntas de gutapercha con Hidróxido de Calcio.

Se concluye que las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio no inhibieron el crecimiento de cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Por lo tanto, su efecto bactericida fue nulo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la Endodoncia, dentro del campo de la Odontología es estudiar los procedimientos mediante los cuales se puede preservar las piezas dentales que presentan alteraciones a nivel pulpar debido a irritantes de tipo físico, mecánico y biológico. Dentro de los irritantes de tipo biológico se encuentran las bacterias.

Las bacterias y sus productos son considerados como el agente etiológico principal de producir afecciones a nivel pulpar, tales como: necrosis pulpaes y lesiones periapicales; por consiguiente su control es uno de los pasos más importantes en la terapia endodóntica.

Se sabe por estudios previos que una de las bacterias que se ha encontrado con mayor frecuencia en infecciones endodónticas persistentes es el *Enterococcus faecalis*. Debido a que es una bacteria anaerobia facultativa resistente a la mayoría de medicamentos intraconducto que se utilizan normalmente. Además tienen la capacidad de adherirse dentro de los tubulillos dentinales formando una película biológica (biofilm) aparente, lo cual le confiere la capacidad de soportar ambientes hostiles y por tal razón es más difícil su eliminación del sistema de conductos radiculares. (1, 2, 6, 11, 16)

Otra bacteria que comúnmente se ha aislado del sistema de conductos radiculares infectados es el *Fusobacterium nucleatum*, que es un bacilo anaerobio estricto el cual está asociado frecuentemente a patologías periapicales. (9, 12, 16)

Debido a la importancia que representa la medicación en los conductos radiculares fue necesario realizar el presente estudio para analizar la efectividad de ciertos medicamentos disponibles en el mercado, como son las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio con el objeto de aplicarlo eventualmente en la medicación de conductos radiculares de una forma más práctica y eficiente.

ANTECEDENTES

Los microorganismos son los principales y más importantes agentes patógenos a nivel de la cavidad pulpar y periápice radicular. ^(1, 5, 6,7, 9, 10, 11, 13)

Las bacterias *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis* se han aislado de procesos infecciosos del sistema de conductos radiculares. ⁽⁷⁾ El *Enterococcus faecalis* es un coco Gram. (+) del grupo D anaerobio facultativo, es un componente saprófito de la flora entérica y no pertenece a la microbiota normal de la cavidad bucal, (infección exógena). Resistente y de difícil control cuando se asocia a infecciones periapicales crónicas debido a que esta bacteria tiene la capacidad de introducirse dentro de los tubulillos dentinarios, si el pH del hidróxido de calcio disminuye de 12.5 esta bacteria puede sobrevivir, también existen estudios que sugieren que tiene la capacidad de formar una película biológica. ^(1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12,)

El *Fusobacterium nucleatum* es un bacilo Gram. (-) muy pleomórfico, inmóvil, no fermentativo, anaerobio estricto, posee una endotoxina en su pared celular capaz de inducir respuestas a nivel periapical aún en pequeñas cantidades produciendo destrucción ósea; la combinación de esta bacteria con *Peptostreptococcus* incrementan el grado de destrucción periapical. Es común encontrarlo en los abscesos periapicales, su hábitat primario es el surco gingival.

Estas bacterias cuando infectan el espacio endodóntico son tratadas utilizando medicamentos como hidróxido de calcio Ca(OH)_2 con diferentes vehículos, ^(5, 7, 9, 12, 13) el cual se aplica dentro del conducto con la ayuda de un léntulo, aunque no existe la certeza que medicando de esta manera llene la totalidad del conducto en longitud y anchura ^(6, 7, 8). Además se sabe que éste actúa por contacto, si no se encuentra lleno todo el conducto su efectividad será cuestionable ⁽⁷⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen opciones de materiales de obturación temporal para el tratamiento endodóntico, tales como las puntas de gutapercha con diferentes medicamentos, los cuales permiten que la medicación llene todo el conducto, por lo que su efectividad sería mejor y se esperaría controlar y eliminar de una forma más efectiva la contaminación microbiana con esta opción de tratamiento. Por lo anterior surge la interrogante ¿Cuál es el efecto bactericida de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*?

JUSTIFICACIÓN

Debido a que varias casas comerciales lanzan al mercado diferentes materiales dentales, en especial la casa Roeko, que está produciendo un nuevo producto que sirve específicamente para medicar conductos radiculares necróticos. Este producto consiste en puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.

Por tal motivo es necesario hacer una investigación para verificar su efecto bactericida, debido a que se necesitan nuevas alternativas de medicación en Endodoncia para brindar un material de fácil manipulación a los estudiantes de Odontología, y a la vez, para que cuenten con otras técnicas para medicar el sistema de conductos radiculares.

REVISIÓN DE LITERATURA

BACTERIAS

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las bacterias son microorganismos que pertenecen al reino procariota de modo que presentan una estructura celular simple y sin membrana nuclear. Pueden crecer sin el auxilio de un organismo superior. Las bacterias se reproducen por división simple o fisión binaria, lo que en algunos géneros da origen a agrupaciones características, al quedar las células unidas de determinada forma. No obstante, cada célula es fisiológicamente independiente, son seres unicelulares ⁽²⁴⁾.

FORMAS Y AGRUPACIONES BACTERIANAS

Las formas principales son tres: esférica o coco, alargada o bacilo, incursada o espiralada ⁽²⁴⁾.

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA:

En 1890, Willoughby D. Miller publicó el libro "Microorganisms of the Human Mouth", que llegó a ser la base de la Microbiología Dental en Estados Unidos. En 1894 Miller se convirtió en el primer investigador en identificar bacterias en la pulpa infectada. En 1910 William Hunter, médico inglés, postuló que los microorganismos de una zona de infección localizada podrían diseminarse a otras partes del cuerpo y producir enfermedad general grave, entidad conocida como anacoresis ⁽³²⁾.

Esta idea es lo que se conoce de manera formal como la "teoría de la infección focal" durante años dificultó la aceptación de los tratamientos de conductos radiculares. Incluso en 1951, A. Knapp citó varios casos clínicos en los cuales pacientes con degeneración de la retina y ceguera se curaron con la extracción de varios dientes infectados. Cuando en estudios controlados se investigó que esta suposición, de la teoría de la infección focal llegó a su término ⁽³²⁾.

En 1939, E. Wilfred Fish investigó zonas en el tejido que se formaban en respuesta a la infección y reconoció cuatro áreas distintivas de reacción. Luego, Fish relacionó estos datos óseos con las infecciones de la pulpa dental. Postuló la teoría que cuando se encuentra un nido necrótico es preciso limitar la función de la cirugía a la eliminación del cuerpo extraño y a la zona necrótica y el secuestro. La infección no progresaría más allá de las zonas de granulación. La investigación de Fish constituyó la base para el tratamiento endodóntico, la anacoresis llegó a ser otro campo de

investigación en relación con el papel de las bacterias en el tratamiento de conductos radiculares. Éste término se define como el proceso mediante el cual colorantes, pigmentos, sustancias metálicas, bacterias, proteínas extrañas y otros materiales de la circulación sanguínea son atraídas a las zonas de inflamación y allí se fijan. Más tarde, Richard citó casos clínicos en los cuales bacterias de sitios extrabucales se localizaban en las pulpas de piezas dentarias obturadas^(32,37).

En 1941, Robinson y Bolin citaron el desplazamiento de las bacterias sistémicas hacia las pulpas inflamadas. Los autores interpretaron su información en el sentido de que ciertos casos de pulpitis idiopática postoperatoria son resultado de la anacoresis: “pulpitis anacorética”⁽³²⁾.

La anacoresis todavía es de interés para los facultativos actuales, en pacientes con endocarditis bacteriana relacionada con problemas dentales⁽³²⁾.

La importancia real de las bacterias en el proceso de degeneración pulpar fue demostrada en el estudio clásico de Kakehashi, Stanley y Fitzgerald, en 1965. Estos investigadores no encontraron cambios patológicos en las pulpas expuestas o en los tejidos perirradiculares de ratas gnotobióticas. Sin embargo, en animales convencionales, las exposiciones pulpares dieron lugar a necrosis y formación de lesiones perirradiculares. Se concluyó que la presencia o ausencia de flora microbiana era el principal factor determinante de la destrucción o reparación de pulpas de roedores expuestas⁽³²⁾.

En 1981, Moller y cols., también ilustraron la importancia de las bacterias en la formación de patosis pulpar. En su estudio no se demostraron cambios perirradiculares en el tejido pulpar necrótico no infectado. Se encontraron reacciones inflamatorias perirradiculares, en los dientes infectados con bacterias. De nuevo, se demostró la importancia de éstas en la génesis de la enfermedad pulpar y perirradicular⁽³²⁾.

Sundqvist llevó a cabo un estudio crucial que pronosticó la relevancia de las bacterias y su relación con la enfermedad perirradicular⁽³²⁾.

MICROBIOLOGÍA PULPAR

Las infecciones de origen endodóntico son producidas frecuentemente por los microorganismos bucales que ganan su acceso a la pulpa y a los tejidos periapicales. Estas infecciones son polimicrobianas con predominancia de las bacterias anaerobias estrictas^(7,24).

La complejidad de una infección endodóntica depende de las propiedades de las especies microbianas infectantes, de las condiciones de los tejidos de la pulpa y de los factores de defensa del hospedero⁽²⁴⁾.

INFECCIÓN DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

En las últimas dos décadas ha habido grandes avances en el conocimiento de la etiología y patogenia de las lesiones pulpares y periapicales ⁽²⁴⁾.

Los microorganismos llegan a la cámara pulpar por diferentes vías: Por fractura del tejido dentario como resultado de la evolución natural de la caries dental y por procedimientos odontológicos. Otras fuentes de infección son los túbulos de dentina expuesta en la superficie de raíz debido a fisuras en el cemento, caries radicular y/o enfermedad periodontal ⁽²⁴⁾.

Los túbulos dentinarios expuestos por caries, las microfracturas coronarias y radiculares o las bolsas periodontales profundas son las vías más probables de infección endodóntica ⁽²⁴⁾.

Mientras el frente microbiano no llegue a la pulpa y la infecte la evolución puede ser transitoria e irreversible. La exposición continua a los productos bacterianos afecta los tejidos de la pulpa y desvitaliza los que se encuentran debajo de los odontoblastos destruidos ⁽²⁴⁾.

Cuando la pulpa se expone a la microbiota bucal a través de una cavidad, el tejido pulpar se ve expuesto a concentraciones mayores de productos microbianos ⁽²⁴⁾.

Las enzimas, las toxinas y otros productos metabólicos difunden a través del tejido pulpar y pueden causar reacciones en la parte apical e incluso en tejidos periapicales ⁽²⁴⁾.

Se reconocen más de 400 géneros y especies microbianas diferentes que colonizan la cavidad bucal humana; parte de esa numerosa microbiota puede infectar la cámara pulpar cuando los tejidos duros del diente o los de soporte pierden su integridad ⁽²⁴⁾.

Hay similitud entre la taxonomía de los microorganismos aislados de las bolsas periodontales profundas en dientes que sufren periodotitis del adulto y de los conductos radiculares de los dientes con procesos periapicales ⁽²⁴⁾.

La microbiota del conducto radicular de dientes no cariados con pulpa necrótica y enfermedad periapical está dominada (>90%) por anaerobios obligados, por lo común, pertenecientes a los géneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus*. ⁽²⁴⁾

En la composición microbiana, apical y periapical de los conductos radiculares de los dientes con caries coronarias hay una cantidad mucho menor de anaerobios estrictos (< 70%) ⁽²⁴⁾.

En los conductos radiculares necróticos se han identificado espiroquetas, por medio de exámenes de campo oscuro y microscopio electrónico de transmisión. En los conductos y el periápice de dientes tratados con endodoncia convencional, que registran radiolucidez periapical asintomática en los controles postratamiento, se han encontrado predominantemente filamentos gram positivos, bacilos y cocos por medio de microscopía electrónica de transmisión ⁽²⁴⁾.

Recientemente se ha registrado un renovado interés por los microorganismos extrarradicales. Se han comunicado numerosas especies bacterianas recuperadas de sitios

extrarradiculares en lesiones descritas como “lesiones inflamatorias periapicales asintomáticas refractarias al tratamiento endodóntico.”⁽²⁴⁾

CARACTERÍSTICAS Y DETERMINANTES BIOQUÍMICOS DE LA VIRULENCIA DE LA MICROBIOTA ENDODÓNTICA

En las etapas tempranas de la infección pulpar los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos dominan la microbiota y utilizan la mayor parte del oxígeno disponible. La disminución progresiva en la concentración de oxígeno favorece el crecimiento de los anaerobios obligados. Desde el punto de vista nutricional los productos finales del metabolismo de algunas especies microbianas pueden formar parte de la cadena alimenticia de otras.⁽²⁴⁾

RESPUESTA DEL HOSPEDERO

Los factores microbianos y del hospedero intervienen en la patogenia de las lesiones pulpares y periapicales. Al principio la pulpa dental se infecta y luego se vuelve necrótica. El ambiente endodóntico proporciona un hábitat selectivo para el establecimiento de una comunidad microbiana mixta, predominantemente anaerobia en el tercio apical del conducto radicular⁽²⁴⁾.

Los productos de esa microbiota tienen propiedades biológicas tales como antigenicidad, actividad mitogénica, enzimática y activación de las células del hospedero.⁽²⁴⁾

Una respuesta inicial aguda en el periápice generalmente es causada por bacterias que residen en el conducto radicular e invaden directa o indirectamente los tejidos periapicales. Estos microorganismos pueden provocar una respuesta aguda intensa del hospedero, por lo común de escasa duración, que se acompaña de signos clínicos tales como dolor e hipersensibilidad a la percusión en el diente.⁽²⁴⁾

La periodontitis apical aguda incipiente puede remitir, intensificarse, formar abscesos, fistulizarse, difundir hacia el hueso (absceso alveolar) o volverse crónica.⁽²⁴⁾

La presencia continua de factores irritantes (microorganismos y sus productos) en los conductos radiculares apicales determina que una inflamación inicial aguda cambie gradualmente a una lesión encapsulada en tejido conectivo, colágeno rico en macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que se transformará en un granuloma.⁽²⁴⁾

Un granuloma puede permanecer asintomático durante largo tiempo sin mayores cambios en el estudio radiográfico. Sin embargo, el delicado equilibrio en el periápice puede romperse en cualquier momento. Las bacterias pueden avanzar al tejido periapical y el granuloma crónico puede transformarse en agudo con manifestaciones clínicas. Como resultado pueden encontrarse microorganismos intracelulares y extracelulares durante estos episodios agudos. Esta exacerbación

puede ocasionar una rápida resorción ósea y un aumento del área radiolúcida. La progresión del proceso de inflamación crónica y aguda es discontinua, con períodos de exacerbación luego de períodos de estabilidad y remisión.⁽²⁴⁾

Recientemente se ha estado utilizando una técnica realmente beneficiosa en el campo de la microbiología, que nos ayuda a identificar de una mejor manera que tipo de bacterias se encuentran en cierto tipo de infecciones.

De manera que varios estudios realizados en endodoncia se han preocupado por identificar el ADN bacteriano en sus estudios. Siendo dicha técnica muy importante hoy en día. Es llamada: Reacción en cadena de la polimerasa.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Antes de entrar de lleno a las características de cada una de las bacterias, es necesario saber acerca del nuevo método que se ha estado utilizando para la identificación de las bacterias, el cuál es más específico y más confiable que otros métodos que se utilizan actualmente.

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (“Polymerase Chain Reaction”), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre lo indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se desea copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés “primer”)⁽⁸⁾

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos:

- 1.Desnaturalización: Es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se requiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.
- 2.Identificación de las cadenas de ADN (cebador): A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

3. Amplificación: Este último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. El problema con el que se encontraron los científicos que idearon esta técnica es que es preciso aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores por encima de los 70°C para que las dos cadenas de ADN se separen. A estas temperaturas tan elevadas la ADN polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo. Esto fue así hasta que se descubrió la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales en los geisers de Yellowstone y cuya ADN polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN. ⁽⁸⁾

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, ellos son: no es una técnica cuantitativa y una relativa alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa. ⁽⁸⁾

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. ⁽⁸⁾

Enterococcus faecalis

MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN

Los diferentes estudios de hibridación de ADN y ARN muestran que los estreptococos del grupo D, *Enterococcus* y no *enterococcus* pertenecen a diferentes géneros, por lo tanto, se ha propuesto que *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. cassellflavus* sean reclasificados como miembros del género *Enterococcus* ^(17, 28).

El *E. faecalis* es un coco Gram positivo anaerobio facultativo es fermentativo y no forma esporas ^(9,18). Las células del *enterococcus faecalis* son esféricas u ovoides y de 0.5 a 1 µm de diámetro. Pueden aparecer solos en pares en cadenas cortas y en medios líquidos no son capsulados,

algunas veces posee un flagelo insuficiente que le confiere movilidad, y son frecuentemente elongados en dirección de la cadena; poseen requerimientos nutricionales complejos. La mayoría son no hemolíticos e inmóviles, las colonias que se observan en la superficie del agar sangre son circulares, lisas y enteras. El G+C contenidos de los rangos del ADN es de 37 a 40 mol %. ^(17,19)

Desde finales de los años 80 e inicios de los 90, este microorganismo comenzó a emerger como uno de los más importantes agentes nosocomiales, responsables de bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones del tracto urinario ^(17,19).

HÁBITAT

Los *enterococcus* se encuentran aproximadamente en todos los animales (como en aves, reptiles, insectos) y plantas. En el humano, son flora normal del tracto gastrointestinal (TGI), tracto genito urinario (TGU), vías respiratorias superiores, cavidad bucal, piel, vagina y uretra femenina. También se hallan en las superficies del entorno ambiental, en el agua, en la vegetación, resultado de la contaminación por excrementos de animales y en aguas albañales no tratadas. En el humano la concentración del *enterococcus* en las heces es de 10 UFC/g ^(17,19)

FACTORES DE VIRULENCIA

Poco se conoce sobre los factores relacionados con la colonización, la translocación intestinal, adhesión hística, evasión de la respuesta del hospedero y la modulación de la respuesta inflamatoria.

Dentro de los factores de virulencia estudiados se encuentran:

- 1.- Producción de citolisina.
- 2.- Fabricación superóxida extracelular (O₂)
- 3.- La actividad citocromo c reductasa.
- 4.- Proteínas de superficie ESP
- 5.- Producción de sustancias de agregación enterococales (EAS).
- 6.- Gelatinasa.
- 7.- Hemolisina.

Se ha descrito la capacidad de producción de sustancias de agregación o “biofilms” (película biológica), conocida como placa, la cual comprende comunidades complejas de bacterias embebidas en una matriz de polisacáridos. ⁽¹¹⁾ Se ha encontrado en células vesicales, estos son

altamente resistentes a la terapia antimicrobiana, lo que explica el incremento de las infecciones enterocócicas en pacientes tratados previamente ⁽¹⁷⁾.

Su habilidad para producir enzimas que posiblemente podrían relacionarla a su mecanismo de patogenicidad. ⁽¹⁷⁾

ASOCIACIÓN DE *Enterococcus faecalis* CON INFECCIONES ENDODÓNTICAS

El *Enterococcus faecalis* ha mostrado ser altamente resistente una vez establecido en el sistema de los conductos radiculares, que pueden mostrar un papel importante, en fracasos endodónticos ⁽¹⁰⁾

En un porcentaje de 85% a 91% Sunqvist et al, recobró numerosas especies de bacterias anaerobias de tratamientos de conductos radiculares fracasados. Una de estas bacterias incluyen *Enterococcus faecalis*. De todos los casos estudiados, se encontró que el *Enterococcus faecalis* fue la bacteria mas prevalente en fracasos endodónticos. ^(2, 4, 22)

Sunqvist et al., encontró que arriba del 38% de los fracasos endodónticos estaban contaminados con *Enterococcus faecalis*, lo cual indica que esta bacteria es un agente importante causante de fracasos endodónticos. ⁽²²⁾

Siren et al., mostró que las bacterias entéricas fueron cultivadas mas frecuentemente cuando los conductos no se sellaron entre cada sesión mientras el número de sesiones se incrementaba y en casos de retratamiento, *Enterococcus faecalis* fue la mas común de todas las bacterias entéricas, presentándose en casos de monoinfección en un 33%. ⁽²¹⁾

Sin embargo los enterococos no son favorecidos por las condiciones que se dan en los conductos no tratados. Ellos forman un pequeño porcentaje de la flora inicial en los conductos radiculares. No obstante, una vez que ellos entran al sistema de conductos radiculares y comienzan a establecerse, ellos pueden resistir la terapia antimicrobiana incluyendo medicamentos intermedios, y persistir después de la obturación. La presencia de *Enterococcus faecalis* en el momento de la obturación puede reducir significativamente el porcentaje de éxito en el tratamiento de conductos radiculares. ^(22,25)

Una de las razones por las cuales el *Enterococcus faecalis* ha mostrado infectar rápidamente los tubulillos dentinales es debido a que éste puede persistir dentro de los mismos hasta 10 días sin suplemento nutritivo (inanición potencial) y prosperar cuando la fuente de nutrientes es restablecida. Todas estas propiedades ayudan a explicar la alta prevalencia significativa del *Enterococcus faecalis* en fracasos endodónticos. ^(13,17, 23)

Otra característica importante para la supervivencia de esta bacteria se debe a su alta capacidad para tolerar y crecer en ambientes altamente alcalinos (pH de 9.6) que normalmente inhibe a otras bacterias ⁽¹⁷⁾. Otros autores sugieren que el *Enterococcus faecalis* forma una película biológica gracias a la cual sobrevive por un período de 77 días en conductos radiculares medicados con hidróxido de calcio. ⁽¹⁹⁾

Isabela N. Roças y col., realizaron un estudio a cerca de la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en las distintas formas de enfermedades perirradiculares. Tomando muestras de casos de dientes con lesiones periapicales crónicas asintomáticas, periodontitis apical aguda, abscesos periapicales agudos y de conductos radiculares tratados y asociados con lesiones periapicales crónicas asintomáticas. ⁽²³⁾

Estudios han revelado que el *Enterococcus faecalis* tiene la habilidad de penetrar los tubulillos dentinales a veces a una profundidad extensa. Esta propiedad puede hacer que estas especies sean capaces de escapar de la acción de los instrumentos endodónticos y los irrigantes usados durante la preparación quimio-mecánica. ^(13,17)

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium: El género se incluye en la familia Bacteroidaceae, entre las especies que comprende se encuentra el *Fusobacterium Nucleatum*. ⁽¹⁷⁾

Las fusobacterias son bacteria lramnegativas anaerobias obligadas no esporuladas con una forma fusiforme característica (forma de huso) y presenta varillas que producen grandes cantidades de ácido butírico, con frecuencia son pleomórficas, no forman esporas, que aparecen como bacilos de pares con apariencia de cigarro alargado. Son quimioorganotrópicas, metabolizando peptona o carbohidratos, pero en general sólo levemente fermentativas. Su producto final es mayormente butirato, frecuentemente con acetato y lactato y menores cantidades de propionato, succinato, y formato. No produce isobutirato e isovalonato Algunas cepas son móviles por la presencia de flagelos peritricos, aunque la mayoría son inmóviles y no capsulados. ⁽¹⁷⁾

Estas bacterias fueron aisladas por primera vez junto con espiroquetas, en un caso de gingivitis ulcerosa asociada con la infección conocida como gingivitis ulceronecrotizante aguda (GUNA). ⁽¹⁷⁾

En la cavidad bucal se han tipificado dos especies de fusobacterias, a saber: *Fusobacterium nucleatum* y *fusobacterium periodonticum*. ⁽¹⁷⁾

F. nucleatum puede ser aislada de pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior y de la cavidad bucal en lesiones periodontales. ⁽¹⁷⁾

CULTIVO. Crecen en anaerobiosis a 35 y 36 °C, a pH 7, en medio de agar –sangre con vancomicina. Son catalasa negativa; no reducen NO₃ a NO₂; no producen ureasas. ⁽¹⁷⁾

PARED CELULAR. Poseen lipopolisacáridos (LPS), con algunos de los componentes típicos presentes en las bacterias entéricas. No tienen cápsula. ⁽¹⁷⁾

MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Uno de los objetivos de la terapia endodóntica es la reducción o eliminación de las bacterias y sus productos del sistema de conductos radiculares. La adecuada limpieza e irrigación y desinfección han mostrado una significativa reducción y, a veces, eliminación de las bacterias de los conductos radiculares. ^(2, 6, 10, 13)

Byström y col, 1987 sugirieron que un medicamento debe usarse como agente antibacteriano en el conducto radicular después de la instrumentación. La asepsia debe ser controlada, incluyendo la efectiva desinfección del conducto radicular lo cual mostró ser más importante para la cicatrización exitosa de las lesiones ⁽³⁶⁾

Se ha recomendado ampliamente el uso de medicaciones intraconductos para desinfectar el sistema de conductos radiculares. Las razones para el uso de un medicamento para conductos radiculares son:

- a. Para eliminar las bacterias en los conductos radiculares. ⁽¹³⁾
- b. Para prevenir la proliferación bacteriana entre citas, (permitiendo que el contenido del conducto radicular sea inerte y neutralizando los restos necróticos) ⁽¹³⁾
- c. Para actuar como una barrera físico-química previniendo la reinfección y suplementos bacterianos para las bacterias remanentes en los conductos radiculares. ⁽¹³⁾
- d. Disminuir la inflamación del tejido periapical y pulpar remanente. ⁽¹³⁾

El medicamento de elección debe tener baja toxicidad sobre los tejidos perirradiculares. Sin embargo, algunos son inefectivos en la esterilización de los conductos radiculares o son inactivados por el tejido o los fluidos a las pocas horas luego de su aplicación. En adición, algunos tienen efectos tóxicos que impiden la reparación de la lesión periapical. ^(1, 2)

Hohg y Pittford, 1997 indican que un medicamento dentro del conducto radicular debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana y una razonable duración de su acción para poder eliminar todas las bacterias presentes en el mismo. ⁽³⁶⁾

HIDRÓXIDO DE CALCIO

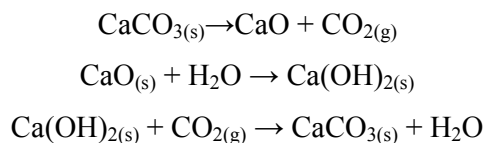
BREVE HISTORIA DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO:

El primer medicamento a base de Hidróxido de Calcio fue introducido en Odontología como un agente endodóntico antimicrobiano por el Alemán B. W. Hermann, en los años de 1,920 y fue denominado Calxyl (Castagnola, 1,956). Desde entonces, este material ha sido usado ampliamente en el tratamiento de lesiones endodónticas. ^(3, 10, 13, 22, 36)

CARACTERÍSTICAS GENERALES:

El Hidróxido de Calcio se presenta como un polvo blanco, granular, amorfo y fino, inoloro, alcalino (su pH oscila de 12.5 a 12.8), lo que le confiere propiedad bactericida (Lasala, 1992; Mondragón 1995), su densidad es de 2.1, es poco soluble en agua (solubilidad es de 1.2g/litro de agua, a temperatura de 25°C), es insoluble en alcohol, con la particularidad de que al aumentar la temperatura disminuye su solubilidad (swinyard, 1980) Citado por Alacam y col., 1990; (Mondragón, 1995). ^(13, 22, 36)

Se trata de una base fuerte obtenida a partir de la calcinación de carbonato de calcio, después de su transformación en óxido de calcio (cal viva). Con la hidratación del óxido de calcio se obtiene el hidróxido de calcio y la reacción entre éste y un gas carbónico se obtiene la formación de carbonato de calcio, representando las reacciones de esta manera. ⁽¹³⁾



PROPIEDADES DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO.

- Es un agente bacteriostático y bactericida para el control de microorganismos, cuando es usado como medicamento dentro del conducto radicular.⁽³⁶⁾
- Agente inductor en los procedimientos de recubrimiento pulpar indirecto, de dentina reparadora, como también en el recubrimiento pulpar directo.⁽³⁶⁾
- Actúa como agente catalizador en la modificación del pH en los tejidos periapicales, para favorecer el proceso de cicatrización.⁽³⁶⁾
- Es un excelente agente higroscópico en el control del exudado en conductos radiculares de dientes con lesiones periapicales grandes, que permanecen húmedos persistentemente.⁽³⁶⁾
- Actúa como barrera periapical, cuando se coloca como tapón dentro del conducto radicular, para el sellado apical y permitir la obturación convencional.⁽³⁶⁾
- En los procedimientos como perforaciones y fracturas es necesario promover la formación de tejido calcificado, su uso es indicado con frecuencia, debido a su potencial osteogénico y osteoinductor.⁽³⁶⁾
- En los procesos resorptivos se considera un medicamento modulador de la actividad clástica, actuando en su prevención o detención.⁽³⁶⁾
- No es tóxico para los tejidos.⁽³⁶⁾

USOS DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO:

Su uso en endodoncia abarca diversas situaciones clínicas; su aplicación se ha expandido incluso por su adición a fórmulas de muchos materiales, como bases dentinarias, agentes recubridores pulpares, materiales de obturación temporal del conducto radicular y cementos selladores de conductos radiculares.^(13, 36)

MECANISMO DE ACCIÓN DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO:

El fundamento básico para la selección de cualquier medicamento intraconducto es conociendo su mecanismo de acción sobre los microorganismos predominantes en las infecciones de los conductos radiculares y lesiones periapicales. De modo general, las sustancias antimicrobianas, el grupo de los antibióticos y / o quimioterapéuticos, promueven dos tipos de efecto sobre los microorganismos, inhibiendo el crecimiento o su reproducción, o inducen una inactivación celular. Estos efectos se expresan en la síntesis de la pared celular, en la estructura de la membrana celular, la síntesis de las proteínas, la replicación cromosómica y el metabolismo intermediario. En esta línea de pensamiento podría cuestionarse en que nivel el hidróxido de calcio ejerce su efecto controlador. Anotándose como referencia, el conocimiento microbiológico y farmacológico de los antibióticos quimioterapéuticos sobre los microorganismos y mas específicamente, en su sitio de acción, el mecanismo de acción del hidróxido de calcio, como antimicrobiano podría ser mejor elucidado. Por consiguiente es importante analizar por separado el efecto de pH sobre el crecimiento y metabolismo en la división celular bacteriana. ⁽¹³⁾

La variación del pH se refleja en el crecimiento bacteriano, una vez que tiene influencia su actividad enzimática. La velocidad de las reacciones químicas favorecidas por las enzimas que son influenciadas por el sustrato. Estas enzimas suelen estar presentes tanto extra o intracelularmente. Las enzimas extracelulares actúan sobre los nutrientes, carbohidratos, proteínas y lípidos, que por medio de las hidrolasas favorecen la digestión. Las enzimas localizadas en la membrana citoplasmática están relacionadas con el transporte de sustancias dentro y fuera de las células, con la actividad respiratoria y con la estructura de la pared celular. El transporte por la membrana es fundamental para sus reacciones metabólicas complejas, crecimiento y reproducción, así como para la necesidad de controlar el flujo de nutrientes. ⁽¹³⁾

Kodukula et al dice que en condiciones de pH elevado (baja concentración de iones hidrógeno), la actividad enzimática de las bacterias se inhibe, cada enzima posee un pH óptimo para su acción, seguida de una velocidad máxima. El pH interno de las bacterias es diferente al pH externo, debido a que su valor oscila en torno a la neutralidad. Sin embargo, el mecanismo que mantiene esa neutralidad aun no se conoce. Debido a este hecho la diferencia del pH interno y externo de la célula puede determinar el mecanismo a través del cual la actividad celular se ve afectada por la acción de los iones hidroxilo. ⁽¹³⁾

Aun se considera la existencia de un gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, que es la responsable de producir energía para el transporte de nutrientes y componentes orgánicos para el interior de la célula. Este gradiente puede ser afectado por el cambio del pH en el medio, influenciando el transporte químico a través de la membrana. ⁽¹³⁾

De esta manera, el efecto del pH sobre el transporte químico puede ser directo o indirecto. Será directo cuando el pH influencia la actividad específica de las proteínas de la membrana (combinación con un grupo químico específico). Su efecto indirecto puede llevar a alteraciones de los estados de ionización de los nutrientes orgánicos, los componentes no ionizados son transportados más fácilmente a través de la membrana celular que los ionizados. De esta forma, conforme el pH puede haber aumentado la disponibilidad de nutrientes y un transporte intenso, puede inducir la inhibición de los efectos tóxicos sobre la célula. ⁽¹³⁾

El crecimiento bacteriano en un pH inferior a su pH interno hace que el citoplasma sea más alcalino que el medio, no obstante, cuando el crecimiento ocurre con un pH alto, su citoplasma se vuelve más ácido. El crecimiento bacteriano en un pH elevado puede llevar a complicaciones fisiológicas muy complejas en las bacterias. ⁽¹³⁾

Es importante hacer énfasis en que la membrana citoplasmática se cuenta con tres funciones esenciales: Metabolismo, crecimiento y división celular. Además participa en los dos últimos estadios en la formación de la pared celular, en la biosíntesis de lípidos, transporte de electrones, como enzimas envueltas en el proceso de fosforilación oxidativa, siendo responsable de los mecanismos de transporte de nutrientes y de las etapas de duplicación celular. ⁽¹³⁾

En lo que se dice respecto al pH, son pocas las especies que pueden crecer en un pH menor a 2 o mayor a 10. La mayoría de las bacterias patógenas crecen mejor en un medio neutro, así, de acuerdo con el pH ideal para su crecimiento, estas bacterias pueden ser clasificadas en tres categorías: acidófilas, neutrófilas y alcalófilas. ⁽¹³⁾

Es posible tener una inactivación enzimática reversible (temporal), cuando se coloca en un pH arriba o abajo de lo ideal para su funcionamiento y una vez que vuelve a su pH ideal, la enzima puede volver a adquirir su actividad catalítica. Su actividad enzimática irreversible se puede observar en condiciones extremas de pH, por largos períodos de tiempo, promoviendo una pérdida total de la actividad biológica. ⁽¹³⁾

Estrela et al. reportó que el efecto enzimático del hidróxido de calcio inhibe las enzimas bacterianas, su principal efecto es antimicrobiano y su activación enzimática del tejido con lo cual crea un efecto mineralizador. Estas propiedades resultan de su elevado pH, que a su vez determina la alta liberación de iones hidroxilo. ⁽¹³⁾

Casi todas las dos mil enzimas ya identificadas son proteínas globulares. Otras proteínas globulares funcionan como transporte de oxígeno, de nutrientes y de iones sanguíneos. Algunas son anticuerpos, otras hormonas y otras son componentes de las membranas y ribosomas. La estructura terciaria de una proteína globular depende de su secuencia de aminoácidos, algunos experimentos demuestran que la desnaturalización de algunas proteínas es irreversible. Los valores extremos de

pH causan un desdoblamiento de la mayoría de las proteínas globulares y la pérdida de sus actividades biológicas sin romper sus uniones covalentes del esqueleto peptídico. Por varios años, se pensó en hacer irreversible el proceso de desnaturalización de proteínas. En tanto, se demostró que algunas proteínas globulares desnaturalizadas en consecuencia con el pH recuperan su estructura natural y su actividad biológica, desde que el pH vuelve a adquirir su valor normal, denominando este proceso renaturalización.⁽¹³⁾

Se sabe que la configuración tridimensional nativa de una proteína dada y su configuración es más estable en condiciones biológicas de temperatura y pH, y que, esta configuración es consecuencia automática de su secuencia específica de aminoácidos.⁽¹³⁾

Varias proteínas presentes en la superficie de la membrana celular son especializadas en el transporte de ácidos y bases por la membrana. La regulación del pH celular es fundamental, una vez que los cambios de pH pueden afectar el metabolismo celular, actuando en la ionización de grupos de proteínas por la desconfiguración o alteración de sus actividades. El metabolismo celular, depende del pH para su actividad enzimática, altera el sustrato y altera el crecimiento y la proliferación celular.⁽¹³⁾

Putnam, describiendo la regulación del pH intracelular, menciona que el pH influencia diferentes procesos celulares, tales como:

1. Metabolismo celular
2. Citoesqueleto, pudiendo alterar la forma, motilidad, la regulación de transportadores, la polimerización de elementos.
3. Activación del crecimiento y proliferación celular
4. Conductibilidad y transporte a través de la membrana
5. Volumen celular isoosmótico

De esta forma, muchas funciones celulares pueden ser afectadas por el pH, dentro de éstas las enzimas esenciales del metabolismo celular.⁽¹³⁾

El transporte químico de la membrana celular puede ser alterado por la cantidad de iones hidroxilo presentes, por un proceso de peroxidación lipídica. La pérdida de la integridad de la membrana puede ser observada a través de la destrucción de ácidos grasos insaturados y fosfolípidos. Cuando los iones hidroxilo remueven átomos de hidrógeno, de ácidos grasos insaturados formándose un radical lipídico libre que se liga a una molécula de oxígeno, transformándose en otro radical peróxido lipídico. La peroxidación lipídica puede ser formada nuevamente a partir de un nuevo inductor, iones hidroxilo que roban átomos de hidrógeno de un

segundo ácido graso insaturado, dando como resultado otro peróxido lipídico y otro nuevo radical lipídico libre, transformándose en una reacción en cadena. ⁽¹³⁾

Para explicar mejor el efecto biológico lesivo que produce el Hidróxido de Calcio sobre la membrana celular bacteriana, Estrela et al. estudió el efecto biológico del pH sobre la actividad enzimática de las bacterias anaerobias. Debido a que los lugares enzimáticos están localizados en la membrana citoplasmática, que también es responsable de sus funciones vitales como el metabolismo, crecimiento celular y división, participando en las últimas etapas de la formación de la pared celular, biosíntesis de lípidos, transporte de electrones y fosforilación oxidativa, los autores creen que los iones hidroxilo del Hidróxido de Calcio desarrollan su mecanismo de acción sobre la membrana citoplasmática. El efecto del elevado pH del Hidróxido de Calcio altera la integridad de la membrana citoplasmática por medio de daño químico a los componentes orgánicos y el transporte de nutrientes o a través de la destrucción de los fosfolípidos o ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática, lo cual puede ser observado a través del proceso de peroxidación de lípidos, o de la reacción de saponificación. ⁽¹³⁾

La explicación del mecanismo de acción del pH del hidróxido de calcio en el control de la actividad enzimática bacteriana, permitió que Estrela et al., estableciera la hipótesis de la inactivación enzimática irreversible, en condiciones extremas de pH, por largos periodos de tiempo. Como también la inactivación enzimática bacteriana temporal, cuando el pH vuelve a la normalidad, la acción enzimática bacteriana vuelve a la normalidad. Estrela et al., demostró la actividad enzimática irreversible por medio de un estudio *in VITRO*, el efecto antimicrobiano directo del hidróxido de calcio sobre diferentes microorganismos. Estrela sugiere la hipótesis de una inactivación enzimática bacteriana irreversible que ocurre bajo condiciones extremas de pH durante largos periodos de tiempo y también, una inactivación temporal que ocurre cuando el pH vuelve a niveles óptimos para su acción enzimática y permite al mismo tiempo volver a su normalidad. La inactivación enzimática irreversible fue reportada por Estrela et al., en un estudio *in vitro* donde estableció el efecto antimicrobiano directo del Hidróxido de calcio sobre los microorganismos que utilizó en dicho estudio. Descubrió que con la alteración de la integridad de la membrana citoplasmática se favorece la destrucción de los microorganismos analizados después de 72 horas. ⁽¹³⁾

De acuerdo con Tronstad et al., el mecanismo de acción del hidróxido de calcio es atribuido directamente a su capacidad de disociación en iones calcio e hidroxilo dando como resultado un incremento de pH localmente. ⁽¹³⁾

Calciumhydroxid plus roeko®

DEFINICIÓN:

Son preparados que liberan paulatinamente el Hidróxido de Calcio incorporado en una matriz de gutapercha.

COMPOSICIÓN:

Estas puntas contienen 52% de Hidróxido de Calcio, 42% de gutapercha, cloruro de sodio, un producto tensoactivo y colorante.

INDICACIONES:

A continuación se darán a conocer las distintas utilidades que tienen estas puntas de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

- Relleno temporal del conducto radicular con Hidróxido de Calcio
- Tratamiento de conductos radiculares en casos de emergencia
- Realizar reabsorciones radiculares
- Tratar traumatismos infantiles

PROPIEDADES:

El fabricante indica que la punta se suministra lista para utilizarla, tiene una consistencia dura y flexible para que no se dificulte su colocación en el conducto radicular. El hidróxido de calcio puro se distribuye por igual en la matriz de gutapercha. Tanto el cloruro de sodio como el producto tensoactivo aumentan la solubilidad del hidróxido de calcio y movilidad de los iones, las puntas cumplen con la norma ISO y muestran un color castaño claro para evitar que se confundan con las puntas de gutapercha convencionales.

LIBERACIÓN DE IONES HIDRÓXIDO:

Para iniciar la liberación de iones, se puede aplicar una gota de agua esterilizada a la punta. Sin embargo, una vez introducida la punta en el conducto radicular, la cantidad de fluido procedente de la pared dentinaria, es suficiente para activar el Ca(OH)_2 aunque no se agregue mas agua. La humedad basta para disociar los iones de la punta y crear un entorno alcalino dentro del conducto

radicular que aumenta el pH hasta un valor superior a 12. La concentración de Ca(OH)_2 en la punta garantiza la presencia en todo momento de bastante Ca(OH)_2 .

APLICACIÓN:

Una vez extirpado el tejido pulpar y contenido infectado de los conductos radiculares, hay que irrigar y secar cuidadosamente el interior del mismo. A continuación hay que seleccionar una punta de Calcium Hydroxide PLUS de tamaño igual o siguiente inferior al del último instrumento utilizado para tratar el canal, a fin de conseguir que la punta encaje por sí sola en el conducto sin condensarla. La longitud determinada de antemano se señala en la punta que se introduce hasta el ápice con unas pinzas. En los conductos con formas ovaladas o muy cónicas, se pueden introducir puntas adicionales, pero más pequeñas. Dado que la abertura de acceso es normalmente bastante grande, se puede plegar dentro de la misma la longitud sobrante, procedimiento que facilita también la retirada posterior de la punta.

Salvo opinión en contrario del Odontólogo, se puede sellar herméticamente la abertura de acceso. El producto sellante (p. e. ionómeros vítreos) deben impedir que la humedad de la cavidad bucal pueda penetrar en el conducto radicular durante el tratamiento.

DURACIÓN:

La solubilidad reducida del Ca(OH)_2 da lugar a la liberación de cantidades pequeñas solamente, que saturan rápidamente el fluido circundante, pero la entrada de humedad adicional al interior del conducto radicular libera continuamente Ca(OH)_2 y mantiene un pH elevado, superior a 12. Se recomienda que la punta permanezca dentro del conducto de una a tres semanas. Posteriormente, es preciso sustituir la punta por otra nueva o rellenar definitivamente el conducto radicular. En algunos casos clínicos, hay que sustituir la punta con más frecuencia (cada 3 días).

HIPÓTESIS

Las puntas de Gutapercha con hidróxido de calcio (Plus Point) presentan un efecto bactericida sobre *Enterococcus faecalis* y *fusobacterium nucleatum*.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto bactericida de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

ESPECÍFICOS

1. Determinar el tiempo de efectividad de las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio al estar en contacto con el *Enterococcus faecalis*.
2. Determinar el tiempo de efectividad de las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio al estar en contacto con el *Fusobacterium nucleatum*.
3. Evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de colonias de *Fusobacterium nucleatum* a través de la puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.
4. Evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de colonias de *Enterococcus faecalis* a través de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.

VARIABLES

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES:

1. Puntas de gutapercha con hidróxido de calcio
2. Cepas de *Enterococcus faecalis*.
3. Cepas de *Fusobacterium nucleatum*.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES:

1. Puntas de gutapercha con hidróxido de calcio: Son similares a las puntas de gutapercha convencionales que contienen hidróxido de calcio, que es un polvo granular, amorfo, fino, inoloro, poco soluble en agua y es altamente alcalino (pH 12.8) lo que le confiere su propiedad bactericida.

CEPAS BACTERIANAS:

2. *Enterococcus faecalis*: Es un coco Gram-positivo anaerobio facultativo, fermentativo, no forma esporas, asociado a infecciones endodónticas persistentes.
3. *Fusobacterium nucleatum*: Es una bacteria Gram-negativa anaerobia estricta, no forma espora, tiene forma fusiforme. Frecuentemente se encuentra en infecciones endodónticas.
4. Efecto bactericida: Capacidad de inhibición bacteriana.

DEFINICIÓN DE VARIABLES DEPENDIENTES:

1. Efecto bactericida: Capacidad de inhibición bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo lo realizó la investigadora en el laboratorio clínico del IGSS de la zona 7, bajo la supervisión del microbiólogo.

I PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO:

A continuación se dará una descripción detallada de cada uno de los medios de cultivo que se utilizaron para realizar el trabajo de investigación:

A.) Preparación de los Medios de cultivo:

A.1) Medio de cultivo CTA

Composición del CTA:

Ingredientes	gram/l
Enzima caseína hidrolasa	20.00
L- cistina	0.50
Cloruro de sodio	5.00
Sulfato de sodio	0.50
Rojo fenol	0.017
Agar	2.50
pH final (a 25°C): 7.3 ± 0.2	

Fórmula ajustada, estandarizada y adaptada a un parámetro de funcionamiento.

DIRECCIONES: Suspender 28.5 gramos en 1000 ml de agua destilada. Hervir para disolver el medio completamente. Se dispensa en tubos en cantidades de 8-10 ml. Se esteriliza en autoclave a 15 lb de presión (121°C) por 15 minutos, se enfría a 50°C y se agrega carbohidratos apropiadamente, se mezcla bien y se deja el medio frío en los tubos en posición vertical.

PRINCIPIOS DE INTERPRETACIÓN: El agar cistina triptona puede usarse como un medio de mantenimiento de microorganismos fastidiosos, sin agregar enriquecimientos. Los organismos anaerobios crecen bien en este medio en presencia de CO₂. Puede detectarse motilidad en este medio cuando los cultivos muestran difusión – diseminación de crecimiento por todo el medio. Organismos sin motilidad muestran crecimiento solamente en el área inoculada. Este es un medio base para estudiar reacciones de fermentación de organismos fastidiosos porque está libre de carbohidratos fermentables. Se requiere un inóculo grueso e inmóvil.

A.2) AGAR BASE COLUMBIA SANGRE:

Código CM 331

Es un medio para múltiples usos en cultivo de agentes difíciles.

Fórmula:	g/l
Peptona especial	23.0
Almidón	1.0
Cloruro sódico	5.0
Agar	10.0 pH 7.3 ± 0.2

INSTRUCCIONES:

Se suspenden 39 gramos en un litro de agua destilada. Se lleva a ebullición hasta su disolución completa. Se esteriliza en autoclave a 121°C, durante 15 minutos, luego se enfría a 50°C y se agrega sangre estéril desfibrinada.

DESCRIPCIÓN:

Tradicionalmente la base agar sangre se ha integrado de hidrolizado de caseína o de infusión de carne. Las ventajas del primero radican en la rápida producción de grandes colonias y las del segundo en zonas de hemólisis bien definidas y la buena diferenciación de las colonias.

El agar base Columbia (Ellmer y col) combina las virtudes de ambos, mejorándolos. Esta base es más versátil y de rendimiento superior en múltiples aplicaciones.

Para preparar un medio selectivo se le adiciona suplemento 5-7% v/v de sangre de cordero o caballo.

Suplemento Selectivo:

Staph/Strep

Código sr 70

Suplemento selectivo para aislamiento de *Staphylococcus* y *Streptococcus* cuando se utiliza con agar base Columbia CM 331 o Agar base sangre n2, CM 271. Contenido del vial (cada vial es suficiente para suplementar 500 ml de medio).

Ácido nalidíxico 7.5 mg

Sulfato de colistina 5.0 mg

Este suplemento se utiliza con agar base Columbia y 5% de sangre de cordero desfibrinada para agregar Agar Columbia CNA.

INSTRUCCIONES:

Agregar al vial 2 ml de agua destilada estéril y mezclar hasta que llegue a disolución completa. Se agrega asépticamente su contenido a 500 ml de agar base Columbia CM 331 Agar base sangre n2 estéril y enfriado a 50°C. Se mezclan bien y se reparten en placas petri estériles.

A. 3) Schaedler – Agar.

Medio Deshidratado:

41 935 frasco de 100ml

Este medio reductor, especialmente rico en factores de crecimiento como la hemina, el extracto de levadura y la vitamina K3 esta muy adaptado para el cultivo de los gérmenes anaerobios.

Fórmula en g/l de agua destilada:

Caldo trypticase-soja	10
Bio-polytone	5
Glucosa	5
Extracto de levadura	5
Tris(hidroximetil)amino-metano	3
Hemina	0.01
L-Cistina	0.40
Vitamina K3	0.5 mg
Agar	13.5

pH : 7.3

PREPARACIÓN:

Se fundió el agar en baño maría, hirviendo. Se deja enfriar a 45 °C antes de añadir el 5% de sangre de cordero y las posibles mezclas selectivas. Se coloca en las placas petri estériles que deben usarse el mismo día o almacenadas en una jarra con atmósfera anaerobia.

Después de la siembra las placas se mantendrán a 35-37 °C durante 48 a 72 horas antes de ser examinadas y luego se volverán a incubar durante una semana o más con vistas a una observación final.

UTILIZACIÓN: Se utiliza con el 5% de sangre de cordero. En estas condiciones los gérmenes anaerobios tienen un crecimiento importante y el tamaño de las colonias es superior al obtenido con los medios clásicos. La vitamina K3 es indispensable para el crecimiento de bacterias.

NAD (coenzima I)	2.50 mg
Cocarboxilasa	1.00 mg
Nitrato Férrico	0.20 mg
Thiamine Hydrochloride	259.00 mg
Dextrosa	1.00 mg
Parte II (Fluido rehidratado):	
Dextrosa	1.00 mg
Agua destilada	10.00 ml

PROCEDIMIENTO:

Se disolvió parte del contenido en 10ml de la parte II Fluido rehidratado. Asépticamente se adiciona este a 240 ml de agua estéril, molten G. C. Agar base (M434)/ Medio Thayer Martin Base (M 413)/ Agar Base Chocolate (M 103) con 250 ml de agua estéril, 2% solución de Hemoglobina o a 500ml Agar Base Telurita (M1260), se mezclo gentilmente y se agregó dentro de las cajas de petri estériles.

4) El medio de Tioglicolato USP Código CM 173 es un medio para cultivo de agentes aeróbicos y anaeróbicos en pruebas de esterilidad. Ver cuadro No. 3

Fórmula:	g/l
Extracto de levadura en polvo	5.0
Tristona	15.0
Dextrosa	5.5
Tioglicolato de Sodio	0.5
Cloruro de Sodio	2.5
L-Cistina	0.5
Resazurina	
0.001 Agar	0.5

pH 7.1 = 0.2

INSTRUCCIONES:

Se suspendió en 29.5 gramos en un litro de agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo, se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15-18 minutos.

DESCRIPCIÓN:

El medio está preparado de acuerdo con la fórmula especificada en la farmacopea de EEUU., para realizar pruebas de esterilidad. Es idóneo para el cultivo de organismos, tanto aeróbicos como anaeróbicos. No se requiere ni parafina ni otro sello especial, ni se requiere una jarra anaeróbica para el cultivo de los anaerobios. Está bien taponado, de forma que los inóculos ácidos o alcalinos producen una alteración despreciable en la reacción del medio.

El contenido de tioglicolato sódico del medio neutraliza el efecto bacteriostático de los compuestos mercuriales utilizados como conservantes en soluciones para inyección, etc. Si la solución sometida a prueba contiene una sustancia bacteriostática, es necesario, con el fin de evitar un resultado negativo falso, establecer la actividad bacteriostática del producto por el método descrito en la farmacopea de EEUU.

B.) PROCEDIMIENTO QUE SE REALIZÓ PARA LA SELECCIÓN DE BACTERIAS

Procedimiento *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922) Y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

La investigadora junto con el asesor de laboratorio, obtuvieron las cepas bacterianas que se necesitaron para el estudio por medio del siguiente procedimiento:

B.1) El cultivo puro de *Enterococcus faecalis* proveniente del CTA se siembra en un medio de cultivo Agar sangre de carnero al 5% obtenido del cepario del laboratorio clínico del IGSS de la zona 7 (ver fotografía (a)).



(a) Colonias puras de *Enterococcus faecalis* sobre el medio agar sangre de carnero al 5%, las colonias son pequeñas, redondas, de color blanco. Vista desde un estereoscopio.

B.2) La muestra que se obtuvo era proveniente de un Culti-loop (cultivo puro de *Fusobacterium nucleatum*), que contiene 5 asas, las cuales son de inoculación desechable que contienen

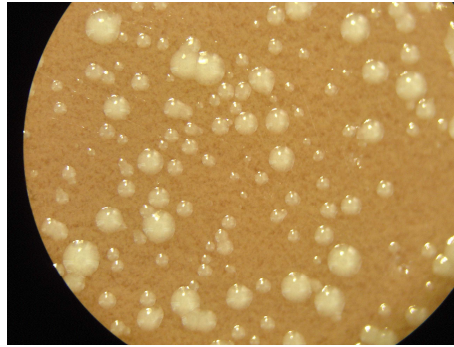
microorganismos viables y estabilizados, destinados para uso en procedimientos de control de calidad en laboratorios.

La película de cada asa es de gelatina. Para poder rehidratar la película, el asa debe entrar en contacto con un ambiente calido y húmedo. Para rehidratar la película se procedió de la siguiente manera:

1. Se retiró la funda roja, luego se separó el asa de su mango y se colocó directamente en un tubo con 0.5 mm a 1.0 ml de medio líquido (caldo de Tioglicolato).
2. Se incubó el tubo a 35°C entre 10 y 20 minutos, agitando suavemente el tubo de ensayo cada 5 minutos para lograr que la película negra se disolviera completamente del asa y así regenerar la suspensión del microorganismo.
3. Luego se realizó la siembra en un medio de cultivo (Agar Chocolate) que es el medio que se utiliza en bacterias anaerobias estrictas (ver fotos b y c).



- (b) Sobres metálicos donde se guardan las asas microbiológicas que contienen al *Fusobacterium nucleatum* que se encuentra en un estado vegetativo.



(c) colonias puras de *Fusobacterium nucleatum* sobre un medio agar chocolate vistas desde un estereoscopio. Las colonias son redondas, grandes y de un color blanco hueso.

B.3) La suspensión de bacterias se introdujo en un caldo enriquecido (Tioglicolato) según los estándares de Macfarland, las cepas que se utilizaron fueron *Enterococcus faecalis* ATCC 25922 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (ver imagen (d)).



(d) Caldos de tioglicolato inoculados con su respectiva colonia bacteriana.

B.4) Se obtuvo la muestra de un medio (Agar Cístina Triptona) el cual se utiliza para el mantenimiento de subcultivos para detectar motilidad, etc. Con adición de carbohidratos, también puede usarse para reacciones de fermentación de organismos.

C.) INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Con una asa se procedió a realizar la inoculación primaria del *Enterococcus faecalis* en el medio de cultivo. Utilizando dos asas flameadas se extendió la inoculación primaria aproximadamente dos centímetros, luego con otra asa se extendió el inóculo y por último con otra asa se hace una tercera extensión del inóculo.

La caja de petri con agar sangre se incubó en una atmósfera rica en CO₂ ambiente microaerófilico a una temperatura de 35°C, los cultivos fueron inspeccionados después de 18 horas de incubación; si el desarrollo microbiano es menor de lo previsto o si las colonias son diminutas deberá volver a incubarse por otras 24 horas (Ver imagen (e)).



(e) Incubadora donde fueron introducidos los medios de agar sangre de carnero con la siembra de *Enterococcus faecalis* y se dejaron allí por 24 horas.

La inoculación primaria del *Fusobacterium nucleatum* fue similar al procedimiento que fue empleado con la otra bacteria. Luego se colocan las 10 cajas de petri con la siembra en una bolsa con ambiente anaeróbico (anaeroculp) con su respectivo indicador de anaerobiosis y luego se dejó en la incubadora a una temperatura de 35 °C durante 72 horas (Ver imagen (f)).



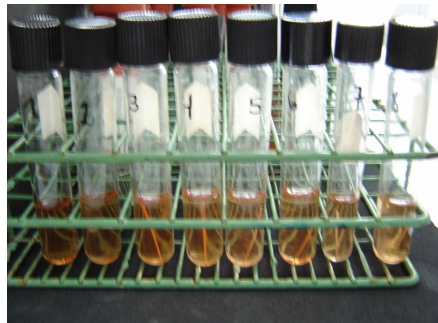
(f) Imagen que muestra el interior de la incubadora en donde fueron introducidos los distintos medios de agar chocolate con la siembra de *Fusobacterium nucleatum*. Debido a que esta bacteria es anaerobia estricta se introdujeron los medios en una bolsa y se colocó un sobre para crear un ambiente de anaerobiosis (anaeroculp) con su respectivo indicador, luego se procedió a sellar las bolsas.

La interpretación del crecimiento: Cuando hay crecimiento en las dos cajas aerobios y anaerobios facultativos, crecimiento solamente en anaerobiosis anaerobio estricto, se realizó la identificación o susceptibilidad.

En el caso de *Fusobacterium nucleatum*, fue necesario realizar la prueba de tinción de Gram para poder realizar su identificación en los medios de cultivo.

C.1) Se utilizaron 16 tubos de ensayo con caldo de Tioglicolato. El número uno de control sólo contenía el caldo de tioglicolato, el número dos de control: el caldo más las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio.

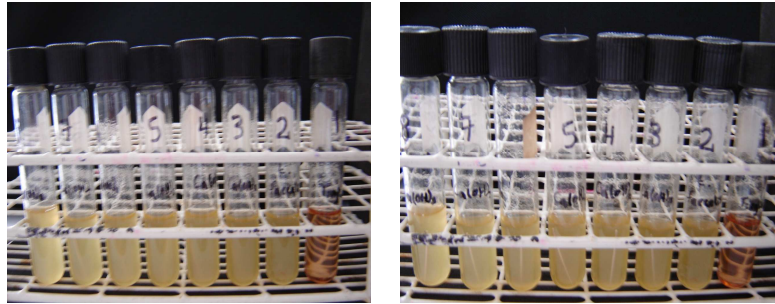
C.2) A los diferentes tubos de tioglicolato se les introdujo una colonia de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*, luego les agregamos las puntas de gutapercha con Hidróxido de calcio y se incubaron por 24 horas a 35°C (ver fotografía (g)).



(g) Luego de inocular los tubos que contienen el medio de Tioglicolato con una colonia pura de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*, se colocaron las puntas de gutapercha con Hidróxido de Calcio.

C.3) Interpretación de los resultados:

A las 24 horas de incubación se evaluaron las diferentes concentraciones de bacterias en cada uno de los tubos, pero no fue posible realizar la evaluación por más tiempo, debido a que las bacterias crecieron en el medio debido a que está enriquecido con varios nutrientes que favorecen el crecimiento de las mismas (Ver fotografías (a) y (b)).



(h,I) Las fotografías muestran la turbidez en cada uno de los medios de Tioglicolato que fueron inoculados con una colonia de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* en los cuales se introdujeron las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.

D.) ANTIBIOGRAMA

Para observar la efectividad bactericida de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio se realizó la evaluación con la técnica de difusión en agar (método de Bauer-Kirby), el cual consiste en colocar las puntas en el medio sólido de Mueller Hinton) que está inoculado con una suspensión de bacterias *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* con las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 de acuerdo a los estándares de Macfarland, en el cual se observó si hubo alguna inhibición del crecimiento en dichas bacterias. En el caso de el *Fusobacterium nucleatum* su siembra se realizó en agar Chocolate y se trabajó en una atmósfera de anaerobiosis, debido a que esta bacteria es anaerobia estricta. En el cuadro No. 1 pueden observarse las distintas concentraciones que se utilizaron en el estudio.

tubo de ensayo	Concentración de bacterias	Densidad celular
No 1	0.5	1.5×10^8
No 2	1	3×10^8
No 3	1.5	4.5×10^8
No 4	2	6×10^8
No 5	3	9×10^8

Una droga quimioterapéutica es un compuesto químico que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad.

La prueba de susceptibilidad sirve para determinar “*in vitro*” a que antibióticos es susceptible o resistente una determinada cepa bacteriana aislada del paciente. En este estudio se utilizaron cepas de cultivos puros de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

TÉRMINOS:

- Susceptible: Microorganismos responsables de una infección son inhibidos por concentraciones de antibióticos obtenidos con un régimen usual de dosificación.
- Resistente: Cuando los microorganismos que causan la infección, toleran concentraciones de antibiótico superiores a las que pueden obtenerse en la sangre por medio de un régimen usual de dosificación.
- Intermedio: Hoy en día se considera como prueba errática que por lo tanto, debe repetirse, ya que realmente se trata de una población bacteriana resistente.

Actualmente se utilizan dos técnicas para el Antibiograma:

La técnica de Bauer-Kirby, recomendada por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), conocido anteriormente como: Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (NCCLS) y el Antibiograma por dilución automatizado.

La prueba de Bauer-Kirby, ha sido aceptada como la técnica estándar para la realización de las pruebas de susceptibilidad por difusión en discos, y brinda información útil en la mayor parte de los casos. Existen sin embargo unas pocas limitaciones precisas. La prueba debe aplicarse solo a especies bacterianas que han sido totalmente evaluadas.

Preparar el agar Mueller-Hinton según las indicaciones del productor y con las siguientes características:

Las cajas de Petri de tamaño estándar (100 mm de diámetro). Deben llenarse con aproximadamente 25 ml de agar líquido ya autoclaveado, a manera de dar un medio de 4 mm de grueso.

- Fueron guardadas en la refrigeradora dentro de bolsas plásticas selladas (de 2 a 8°C) por no más de 7 días.
- El pH del medio debe ser de 7.2 a 7.4; medir el pH del medio si es posible con potenciómetro.
- De cada lote de medio, se incubaron dos cajas por 24 horas a 35°C, para comprobar la esterilidad. Descartar estas cajas ya que no son adecuadas para efectuar Antibiograma después de ser incubadas.
- Inmediatamente antes de usar el medio agar chocolate, se secó a 36°C, se colocaron las cajas en la incubadora por 20 minutos con el medio arriba y la tapadera ligeramente abierta.

PROCEDIMIENTO:

El Antibiograma se realizó de la siguiente manera:

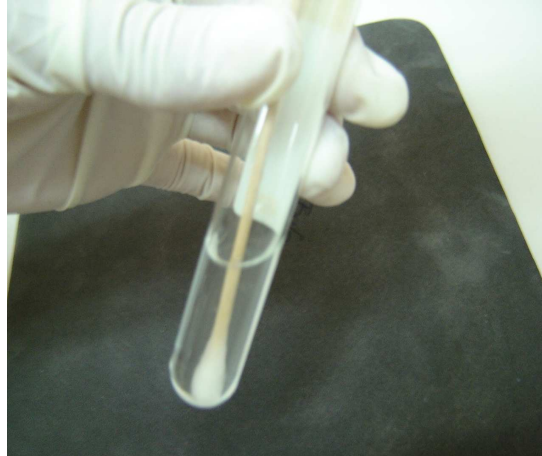
- Con un hisopo estéril se tomaron las colonias necesarias, bien aisladas y de igual morfología del cultivo original en cualquier medio sólido. No está de más enfatizar que debe trasladarse siempre un cultivo puro. (ver fotografía (j))



(j) Con un hisopo se tomaron colonias de *Enterococcus faecalis* necesarias para inocularlas en la solución salina.

- Se realizó la inoculación en un tubo con 5 cc de solución salina.

- Luego, el hisopo se agita en el tubo con la solución para mezclarlo con las colonias bacterianas hasta que aparezca una ligera turbidez. (ver fotografía(k))

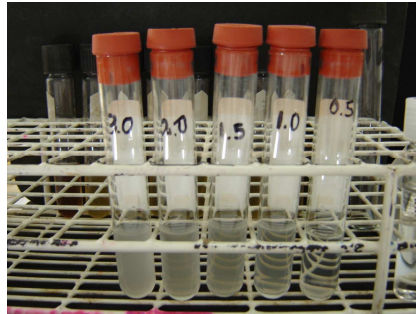


(k) En la fotografía se puede observa como se realizó el procedimiento de inoculación de bacterias dentro de la solución salina.

Se ajustó la turbidez a un estándar de Macfarland 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 si el caldo es más turbio que el estándar se le puede agregar más solución salina estéril. Se colocó este tubo con la mezcla en un aparato que mide la dispersión de la luz (turbidímetro), utilizando un tubo con la solución salina como blanco (Ver fotografías l,m).



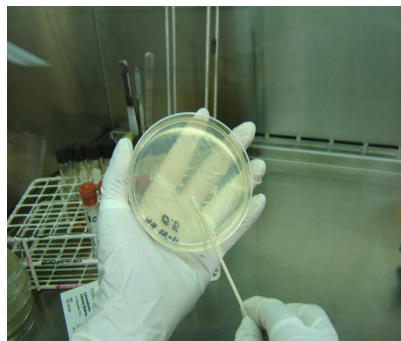
(l) En esta fotografía se muestra el turbidímetro (nefelómetro) en el que se establecieron las distintas concentraciones de bacterias.



(m) En la fotografía se puede observar que a mayor concentración de bacterias es mayor la turbidez de las soluciones.

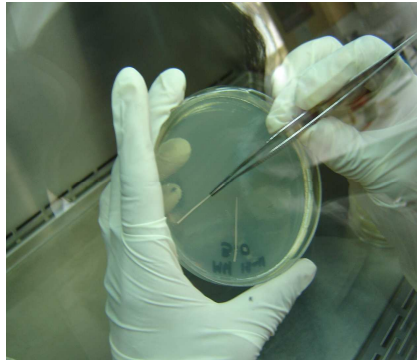
Inmediatamente se procedió de la siguiente manera: introduciendo un hisopo estéril en el caldo de turbidez igual al estándar, exprimiendo bien el hisopo y presionándolo firmemente contra las paredes del tubo, arriba del nivel del caldo.

Con el hisopo exprimido se realizó la siembra en la caja en tres direcciones opuestas sobre toda la superficie, cerca del mechero encendido, para evitar la contaminación durante la siembra. Se dejó secar la caja de 5 a 8 minutos, pero no más de 15 minutos con la tapadera cerrada (ver fotografía n).



(n) Cada una de las concentraciones que se obtuvieron, fueron sembradas en un medio agar Müeller Hinton para *Enterococcus faecalis* y agar Chocolate para *Fusobacterium nucleatum*. La siembra se realizó con un hisopo.

Con las pinzas estériles se colocaron cada una de las puntas sobre las bacterias estudiadas (Ver fotografía ñ).



(ñ) Luego de realizar la siembra, se colocaron las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio con sus distintos calibres (15-45) en cada uno de los medios con sus respectivas concentraciones.

Las cajas se incubaron por 24 horas en el caso del *Enterococcus faecalis*. El *Fusobacterium nucleatum* se dejó incubando por 72 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Después de las 24 y 72 horas de incubación, se examinaron con buena luz las cajas ya crecidas.
- El objetivo era medir en mm el diámetro de los halos de inhibición completa con un calibrador detrás de la caja de petri o con patrones especiales. Pero no fue posible hacer dicha medición debido a que no hubo halo de inhibición.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el presente estudio se utilizó el método estadístico descriptivo. El cual consiste en ordenar y tabular los datos para obtener la media aritmética.

DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS (2-4)

- Se realizó la siembra de las bacterias *Enterococcus faecalis* en los medios de cultivo agar sangre de carnero al 5% y agar chocolate para *Fusobacterium nucleatum*, se incubaron a una temperatura de 35°C y un tiempo de 24 horas para la primera bacteria y 72 horas para la segunda bacteria. (ver tabla No. 2)
- Se utilizó el método Bauer-Kirby modificado para medir el efecto bactericida de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio sobre cepas de *Enterococcus faecalis* en un medio sólido agar Mueller Hinton y se incubó por 24 horas a 35°C y *Fusobacterium nucleatum* en agar chocolate a la misma temperatura por un período de incubación de 24 horas (ver tabla No. 3)
- En la tabla número 3 se presentan los resultados de la preparación de la tinción de Gram, para identificar a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* en los medios de cultivo (10). De ellos en cuatro medios de cultivo estuvo presente la bacteria en los medios No. 5 y 10 no hubo crecimiento, en los cuatro restantes no se observó presencia de *Fusobacterium nucleatum*. (ver tabla No. 4)
- Se determinó la concentración de bacterias basado en los estándares de McFarland, se utilizó un turbidímetro que mide la turbidez de una solución. (ver tabla No. 5)

Tabla No. 2

Condiciones y medios de cultivo utilizados en la siembra de *E. faecalis* y *F. nucleatum*

	Medio de cultivo	Temperatura °C Incubación	Tiempo de Incubación	Ambiente
<i>E. faecalis</i>	Agar Müeller Hinton	35°C	24 horas	Facultativo
<i>F. nucleatum</i>	Agar chocolate	35°C	72 horas	Anaeróbico

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

Medios de cultivo utilizados para las bacterias *E. faecalis* y *F. nucleatum*, los cuales fueron incubados a una temperatura de 35°C, el tiempo que se empleó para dicho procedimiento fue de 24 y 72 horas respectivamente con un ambiente microaerófilico para la primera y anaerobio para la segunda bacteria.

Tabla No. 3

Resultados de la técnica de Gram para identificar *F. nucleatum* en los medios de cultivo

No. de cultivo	Presencia de <i>F. nucleatum</i>
1	No
2	No
3	no
4	no
5	-
6	si
7	si
8	si
9	si
10	-

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

De las diez cajas de petri que contenían los distintos medios de cultivo donde se realizó la incubación de *F. nucleatum* cuatro fueron positivas a la tinción de Gram y dos no presentaron crecimiento y en las cuatro restantes crecieron otro tipo de bacterias.

Tabla No. 4

Medios de cultivo utilizados para realizar el Antibiograma
(Metodo de Bauer-Kirby modificado)

Bacteria	Medio de cultivo	Temperatura de Incubación	Tiempo de Incubación	Ambiente
<i>E. faecalis</i>	Agar Mueller Hinton	35°C	24 horas	Facultativo
<i>F. nucleatum</i>	Agar chocolate	35°C	72 horas	Anaeróbico

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

Se realizó el antibiograma para las dos bacterias, ambas se incubaron a 35°C, tiempo de incubación de 24 horas para *E. faecalis* y 72 horas para *F. nucleatum* con ambiente microaerofílico para la primera y anaerobio para la segunda bacteria.

Tabla No. 5

Elaboración de la concentración de bacterias tomando como referencia los estándares de Macfarland con la ayuda de un turbidímetro

Dispersión de luz (turbidímetro)	Densidad celular (Macfarland)
0.12	0.5
0.24	1
0.36	1.5
0.48	2
0.72	3

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

Se obtuvieron los porcentajes de bacterias según las distintas concentraciones de las mismas por medio de un aparato utilizado para dicho procedimiento (turbidímetro).

RESULTADOS

Se observaron los medios de cultivo con las siguientes concentraciones basadas en los estándares de Macfarland: 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 de *E. faecalis* sobre los cuales fueron colocadas las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio de calibre 15 al 40. Luego de dejarlas en la incubadora por 24 horas se observó crecimiento de colonias bacterianas alrededor de las puntas (no hubo zona de inhibición), lo cual indica que la bacteria fue resistente al Hidróxido de calcio. Como se observa en la fotografía No. 1. También podemos encontrar los resultados de dicho estudio resumidos en la tabla No. 1.

Al observar los medios de cultivo con las siguientes concentraciones de *F. nucleatum* basados en los estándares de Macfarland: 1, 1.5, 2 y 3, donde se colocaron las puntas de gutapercha que contienen Hidróxido de calcio de calibre 15 al 40. Al dejarlas incubar por 72 horas Se observó la misma conducta que con la otra bacteria utilizada en el estudio: Hubo formación de colonias alrededor de las puntas. En la fotografía No. 2 podemos observar la formación de colonias y en la tabla No. 2 se observa el resumen de los resultados obtenidos en el presente estudio.

Tabla No. 1

Evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio fabricadas en la casa Roeko, sobre cepas de *E. faecalis* en el medio de cultivo Müeller Hinton

Concentración de bacterias	Calibre de las puntas						$\bar{X}$ Halo de Inhibición
	Halo de inhibición						
	15	20	25	30	35	40	
0.5	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

No se observó un halo de inhibición en las distintas concentraciones de bacterias con respecto al calibre de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.

Tabla No. 2

Evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio fabricadas en la casa Roeko sobre cepas de *F. nucleatum* en el medio de cultivo Agar chocolate

Concentración de bacterias	Calibre de las puntas						$\bar{X}$ Halo de inhibición
	15	20	25	30	35	40	
1	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN:

No se encontró halo de inhibición en las distintas concentraciones de bacterias respecto al calibre de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio se realizó con la intención de comprobar el efecto bactericida de las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio sobre cepas de *E. faecalis* y *F. nucleatum* en un estudio “*in vitro*”.

Las pruebas se realizaron con la técnica de difusión en agar basándonos en el método de Bauer-Kirby modificado, esta prueba de susceptibilidad llamada Antibiograma sirve para determinar “*in vitro*” a qué antibióticos es susceptible o resistente una determinada cepa bacteriana aislada del paciente.

Primero se evaluaron las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio sobre *Enterococcus faecalis* en agar Müeller Hinton, después de las 24 horas de incubación. Se pudo observar que hubo crecimiento de las bacterias alrededor y sobre las puntas. Por lo tanto la zona de inhibición no estuvo presente en ninguna de las concentraciones bacterianas utilizadas (0.5, 1, 1.5, 2, 3) según el método de Macfarland. Lo cual nos indica que esta bacteria es resistente a las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio.

Luego se realizó la misma prueba en *Fusobacterium nucleatum*, a diferencia de la otra bacteria, se utilizó el agar chocolate y se incubó durante 72 horas. El resultado fue exactamente el mismo que la bacteria anterior. No se formó una zona de inhibición de las colonias bacterianas alrededor de las puntas. Por lo tanto se puede decir que esta bacteria también es resistente a las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio.

La razón por la cual las bacterias fueron resistentes a las puntas de gutapercha con Hidróxido de Calcio podría ser como sugiere Carlos Estrela, que el vehículo mas adecuado para que el Hidróxido de calcio pueda llegar a producir un ambiente alcalino optimo (pH de 12.5) sea la solución salina para lograr uno de los objetivos principales en la Endodoncia, que es desinfectar el sistema de conductos radiculares.



Foto No. 1 en esta fotografía puede observarse el crecimiento de colonias de *Enterococcus faecalis* sobre una de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio



Foto No. 2 En esta fotografía se observa crecimiento de colonias de *Fusobacterium nucleatum* alrededor una de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio

CONCLUSIONES

En este estudio se concluye que:

- No fue posible medir el tiempo de efectividad de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio debido a que el caldo de Tioglicolato está enriquecido con varios nutrientes que favorecen el desarrollo de *Enterococcus faecalis*.
- No fue posible medir el tiempo de efectividad de las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio debido a que el caldo de Tioglicolato está enriquecido con varios nutrientes que favorecen el desarrollo de *Fusobacterium nucleatum*.
- En el estudio “*in Vitro*” realizado en las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio, pudo observarse que no mostraron ser efectivas en la inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

RECOMENDACIONES

Con base en los hallazgos encontrados se recomienda:

- Es aconsejable determinar mediante estudios posteriores la razón por la cual las puntas de gutapercha que contienen hidróxido de calcio no funcionan adecuadamente en la inhibición de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
- Debe considerarse realizar el estudio con otras cepas bacterianas que estén implicadas en los procesos infecciosos de la pulpa dental. Para observar si las puntas de gutapercha con hidróxido de calcio tienen el mismo efecto.

LIMITACIONES

- No fue posible evaluar el tiempo de efectividad, debido a que el medio líquido que se utilizó (caldo de Tioglicolato) está enriquecido con varios nutrientes que hacen favorable el crecimiento de estas bacterias.
- No fue posible llevar a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio (cuantitativa y cualitativamente).

BIBLIOGRAFIA

1. Almydouri, A. et al. (2002). **The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medication: an in vitro study.** J. of Endo. 28(2): 163-167
2. Al-Nazhan, S. (2002). **Antimicrobial activity of extracts of calcium hydroxide points.** Oral sur, Oral med, Oral pat. 93(5): 593-595
3. Andrade de Ferreira, F. et al. (2004). **Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings.** Oral sur, Oral med, Oral pat. 97(3): 388-392
4. Balto, H. (2002). **An assessment of microbial coronal leakage of temporary filling materials in endodontically treated teeth.** J. of Endo. 28(11): 762-764
5. Baron, E. J.; Lance R. P. y Sydney M. F. (1994). **Diagnostic microbiology.** Missouri : Mosby. pp. 169-171.
6. Basrani, B. et al. (2002). **Sustantive antimicrobial activity in clorhexidine-treated human root dentin.** Oral sur, Oral med, Oral pat. 94(2): 240-244
7. Baumgartner, J. C.; Siqueira J. F. y Roças, I. N. (2004). **Geographical differences in bacteria detected in endodontic infecciones using polymerase Chain reaction.** J. of Endo. 30(3): 141-143
8. Biotecnología para la Salud. (2002-2004). **Reacción en cadena de la polimeraza:** Amgen (en línea). España: Consultado el 15 de Jul. 2004. Disponible en: http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak_biotec.muestradoc?p_item=9
9. Chan, S. et al. (2004). **Evaluation of the whole genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of perirradicular lesions.** J. of Endo. 30(7): 518-522.
10. Dartar Oztan, M.; Aysim A. y Dilek D. (2002). **Intracanal placement of calcium hydroxide: a comparison of two different mixtures and carriers.** Oral Sur. Oral med. Oral pat. 94(1): 93-97

11. Distel, John W.; Hatton, J. F. y Gillespie, J. (2002). **Biofilm formation in medicated root canals.** J. of Endo. 28(10): 689-693
12. Donlan, R. M. (2002). **Biofilms: microbial life on surfaces.** (en línea) Atlanta USA: Consultado el 30 de Mayo 2004. Disponible en: <http://www.altcorp.com/affinitylaboratory/oraltotest.htm>
13. Estrela, C. y Figueiredo J. A. (1999). **Endodontia: principios biológicos e mecánicos.** Brazil : Artes Medicas. pp. 574-644.
14. _____ et al. (2002). **Root canal filling with calcium hydroxide using different techniques.** Brazilian Dent. J. 13(1): 53-56.
15. Evans, M. D. et al. (2003). **Efficacy of calcium hydroxide: Chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin.** J. of Endo. 29(5): 338-345.
16. Figueiredo de Almeida Gomes, B. P. et al. (2002). **Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles.** J. of Endo. 28(11): 758-761.
17. Holt, J. G. et al. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9 ed. Baltimore, E U A. : Williams & Wilkins. pp. 296, 528.
18. Khemaleelakul, Saeng-usa.(2002). **Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility.** Oral sur, Oral med, Oral pat. 94(6): 746-755.
19. Lee, W. et al. (2004). **Sonicated extract of Enterococcus faecalis induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes.** J. of Endo. 30(4): 209-212
20. Lynne, R. E. (2003). **In vitro antimicrobial activity of various medication preparation on E. faecalis in root canal dentin.** J. of Endo. 29(3): 187-190.
21. McHugh, C. P. et al. (2004). **pH required to kill Enterococcus faecalis in vitro.** J. of Endo. 30(4): 218-219.

22. Mickel, A. K.; Nguyen, T. H. y Chogle, S. (2003). **Antimicrobial activity of endodontic sealers on enterococcus faecalis.** J. of Endo. 29(4): 257-258.
23. _____; Sharma, P. y Chogle, S. (2003). **Effectiveness of stannous fluoride and calcium hydroxide against enterococcus faecalis.** J. of Endo. 29(4): 259-260.
24. Negroni, M. (2003). **Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica.** Buenos Aires : Médica Panamericana. pp. 9-12, 23-24.
25. Podbielski, A; Spahr, A. y Haller, B. (2003). **Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and clorhexidine on common endodontic bacterial pathogens.** J. of Endo. 29(5): 340-345.
26. _____ Boeckh, C. y Haller, B. (2000). **Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medication on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized cuantitative in vitro assay.** J. of Endo. 26(7): 398-403.
27. Portenier, I. et al. (2002). **Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodine and chlorhexidine digluconate against *enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, tipe- I collagen, and heat-killed microbial whole cells.** J. of Endo. 28(9): 634-637.
28. Roças, I. N; Siquiera, J. F. y Santos K. (2004). **Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases.** J. of Endo. 30(5): 315-319.
29. _____ et al. (2004). **Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south korean population.** J. of Endo. 30(7): 504-508.
30. Siqueira, J. F. et al. (2002). **Actinomyces species, streptococci, and enterococcus faecalis in primary root canal infeccions.** J. of Endo. 28(2): 168-172.
31. _____ et al. (2002). **Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy.** J. of Endo. 28(6): 457-460.

3 - OCT 2007



32. Sugita, E. I. (1994). **Microbiología de la endodoncia**. En: Endodoncia. Ingle, J. I. et al. autores. Trad. José Luis González H. 4 ed. México : McGraw-Hill Interamericana. pp 638-669.
33. Sukawat, C. y Thanapen S. (2002). **A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with enterococcus faecalis**. J. of Endo. 28(2): 102-104.
34. Tanumaru, M.; Leonardo, M. R. y Bezerra da Silva, L. (2002). **Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion**. J. of Endo. 28(4): 295-298.
35. Torres, C. P. et al. (2004). **Intracanal placement of calcium hidroxyde: a comparison of techniques, revisited**. J. of Endo. 30(4): 225-227.
36. Verde, S. y Simonnette, B. (1997). **Aplicaciones clinicas del hidróxido de calcio en la terapia endodóntica**. (en línea). Caracas : Consultado el 15 de Julio 2004. Disponible en : <http://www.dynabizvenezuela.com/images/dynabiz/ID3887/siteinfo/aplicacionesclínicashidroxidodecalcio.pdf>
37. Windholz, M. (1983). **The merck index**. 10 ed. U.S.A. Merck & Co Inc. 1650 p.

Vo. R. 
3 - OCT 2007 

ANEXOS

INSTITUTO GUATEMALTECO DE SEGURIDAD SOCIAL
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HUMANOS
DIVISION DE CAPACITACION Y DESARROLLO

FORMATO PARA SOLICITAR AUTORIZACION DE ESTUDIOS DE TESIS

Guatemala 4 de Octubre de 2004

Yo Claudia Maria Herrera Fuentes estudiante de la Universidad
de San Carlos de Guatemala de la Facultad
de Odontología por este medio solicito sea autorizado realizar mi trabajo de
tesis en la unidad Hospital General de Accidentes del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social,
cuyo tema aprobado
es: "Determinación del efecto bactericida in vitro de las puntas de gutapercha con Hich
de calcio sobre cepas de Enterococcus faecalis y Fusobacterium nucleatum"

Siendo mi asesor (a) Institucional (debe ser miembro del personal del
IGSS) Dr. Guillermo Carrillo

Comprometiéndome a cumplir con la reglamentación vigente para estudios de investigación, así como a entregar
siete ejemplares de la tesis en la División de Capacitación y Desarrollo y a la Unidad en donde se efectuó el estudio.

(f.) [Firma] Estudiante

(f.) [Firma] Asesor (Sello)

(f.) [Firma] Revisor

(f.) [Firma] Jefe del Departamento (Sello)

(f.) [Firma] Director de la Unidad.

USAC

INSTITUTO GUATEMALTECO DE SEGURIDAD SOCIAL
LABORATORIO CLINICO
HOSPITAL GENERAL DE ACCIDENTES

INSTITUTO GUATEMALTECO DE SEGURIDAD SOCIAL
LABORATORIO CLINICO
HOSPITAL GENERAL DE ACCIDENTES
JEFATU
I.G.S.S.

USO EXCLUSIVO DE LA DIVISION DE CAPACITACION Y DESARROLLO

La División de Capacitación y Desarrollo hace constar que la información requerida en este formato (sellos y firmas de
revisor, asesor) se ha cumplido a cabalidad.

Jefe de División de Capacitación y Desarrollo
(Sello)



Instituto Guatemalteco de Seguridad Social
Ciudad de Guatemala, C. A.

Dirección Cablegráfica IGSSO
Dirección Postal: Apartado 349
Teléfono 2326001

DEPARTAMENTO DE RECURSOS HUMANOS; DIVISION DE
CAPACITACION Y DESARROLLO: Guatemala catorce de octubre del dos
mil cuatro.

ASUNTO: Br. CLAUDIA MARIA HERRERA solicitan
autorización para realizar un estudio de
investigación de tesis de pregrado de la Facultad de
Odontología de la Universidad de San Carlos de
Guatemala titulado "Determinación del efecto
bactericida in vitro de las puntas de gutapercha con
Hidróxido de calcio sobre cepas de Enterococcus
faecalis y Fusobacterium nucleatum" en las
instalaciones del Hospital General de Accidentes
en la sección de Laboratorio Clínico.

Vuelvan las presentes diligencias al DR. LUIS EDMUNDO
MORALES SOSA, Director Ejecutivo, Hospital General de Accidentes,
manifestándole que esta Jefatura no tiene ningún inconveniente en
autorizar el Proyecto de Investigación de la Bachiller Claudia María Herrera.

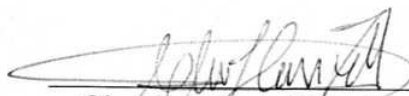

Lic. Leonel Enrique Casasola Chinchilla
JEFE DE DIVISION DE CAPACITACION Y DESARROLLO
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HUMANOS
LECCH/GA.
Anexo: 48 hojas

c.c. Dra. Aída Cifuentes Sosa, Jefe de Laboratorio Clínico,
Hospital General de Accidentes
División de Capacitación y Desarrollo

El contenido de esta tesis es única y exclusiva responsabilidad del Autor:

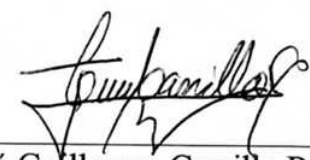


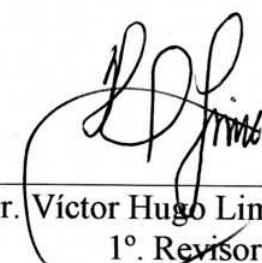
Claudia Maria Herrera Fuentes


Claudia María Herrera Fuentes
Sustentante

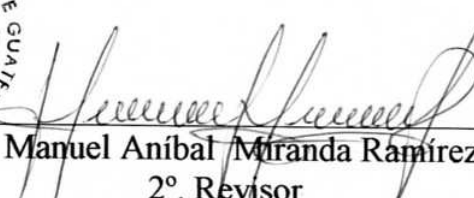

Dr. Werner Edgardo Florián Jeréz
Asesor


Dr. Edwin Ernesto Milián Rojas
Asesor


Dr. José Guillermo Carrillo Paredes
Asesor

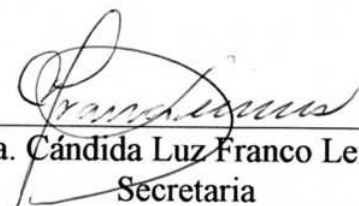

Dr. Víctor Hugo Lima Sagastume
1º. Revisor
Comisión de Tesis




Dr. Manuel Aníbal Miranda Ramírez
2º. Revisor
Comisión de Tesis

Imprímase:

Vo.Bo.


Dra. Cándida Luz Franco Lemus
Secretaria

