

**“DETERMINACIÓN “*IN VITRO*” DEL EFECTO BACTERICIDA DE LAS
PUNTAS DE GUTAPERCHA CON CLORHEXIDINA (ACTIV POINT®)
SOBRE CEPAS DE *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*”**

TESIS PRESENTADA POR:

ELSI MERARI BERNAL NÁJERA

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, MAYO DE 2005

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D.L.

09

T(1561)

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

Decano:	Dr. Eduardo Abril Galvez
Vocal Primero:	Dr. Sergio Armando García Piloña
Vocal segundo:	Dr. Guillermo Alejandro Ruiz Ordoñez
Vocal tercero:	Dr. César Mendizábal Girón
Vocal Cuarto:	Br. Pedro José Asturias Sueiras
Vocal Quinto:	Br. Carlos Ivan Dávila Alvarez
Secretaria Académica:	Dra. Cándida Luz Franco Lemus

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PÚBLICO

Decano:	Dr. Eduardo Abril Galvez
Vocal primero:	Dr. Sergio García Piloña
Vocal segundo:	Dr. Guillermo Alejandro Ruiz Ordoñez
Vocal tercero:	Dr. Werner Florián Jerez
Secretaria Académica:	Dra. Cándida Luz Franco Lemus

ACTO QUE DEDICO

A Dios:

Porque de ti viene la sabiduría y la inteligencia. gracias Dios todopoderoso. eres la razón de mi existir.

A MIS PADRES:

Daniel Bernal y Elsa Nájera. por su amor esfuerzo y apoyo incondicional los llevo en mi corazón.

A MIS HERMANOS:

Mirna. Abigail, Ruth. Arnoldo y Rilo Adoni. gracias por estar siempre a mi lado Dios los bendiga.

A MIS SOBRINOS:

Karen. Luis. Mibeth. Jimena. Kevin. Katlin. Jonathan y Daniel Fernando los quiero mucho.

A MIS CUÑADOS:

Julio. Blanqui gracias por su cariño. en especial agradezco a mi cuñado Luis Lang gracias por el apoyo incondicional.

A MIS ABUELOS:

Teodora y Dionisio los quiero mucho.

A MI FAMILIA:

Tíos y primos los recuerdo siempre.

A MIS AMIGOS:

Claudia. Albita. Daniel. Erick. William. son realmente muy especiales para mí.

AGRADECIMIENTO

A mi Patria Guatemala:

Que mi profesión contribuya a tu engrandecimiento. Dios te bendiga Guatemala

A la Universidad de San Carlos de Guatemala:

Especialmente a la facultad de Odontología.

A mis Catedráticos:

Por compartir sus conocimientos.

A mis Padrinos:

Dr. Luis Lang, Dr. Leonel Bran y Dr. José Figueroa. Muchas gracias.

A mis Asesores:

Dr. Werner Florián, Dr. Edwin Milián y Dr. Guillermo Carrillo. gracias por su ayuda y dedicación para la realización de esta tesis.

Al IGSS de Accidentes:

Gracias por permitir la realización del trabajo de campo de mi tesis en el Laboratorio Bacteriológico. A la Dra. Aida Cifuentes. muchas gracias.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Tengo El honor de someter a su consideración mi trabajo de tesis intitulado:
“DETERMINACION “*IN VITRO*” DE LAS PUNTAS DE GUTAPERCHA CON CLORHEXIDINA (ACTIV 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. Werner Florián Jerez, Dr. Edwin Milián Rojas y Dr. Guillermo Carrillo Paredes, por su valiosa colaboración en este trabajo.

A ustedes distinguidos miembros del Tribunal Examinador, sírvanse aceptar las muestras de mi más alta consideración y respeto.

INDICE

Sumario	2
Introducción	3
Antecedentes	4
Planteamiento del Problema	5
Justificación	6
Revisión de Literatura	7
Objetivos	27
Variables	28
Materiales y Métodos	29
Resultados	46
Discusión de los Resultados	49
Conclusiones	51
Recomendaciones	52
Limitaciones	53
Referencias Bibliográficas	54

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

SUMARIO

Con el propósito de evaluar la efectividad bactericida “*in vitro*” de las puntas de gutapercha que contienen Clorhexidina (Activ Point®) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*, se llevó a cabo esta investigación.

Se realizó la siembra de *E. faecalis* (ATCC 25922) sobre agar sangre de carnero al 5% y la siembra de *F. nucleatum* (ATCC 25586) en agar chocolate suplementado. Se incubaron por 24 y 72 horas respectivamente a una temperatura de 35°C. 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 Mueller Hinton para el *E. faecalis* y agar chocolate para *F. nucleatum* en los cuales se colocaron las puntas de gutapercha conteniendo clorhexidina al 5% con sus distintos calibres (15, 20,25,30,35,40). Se dejaron incubando por 24 horas para la primera bacteria y 72 horas para la segunda.

Los resultados evidencian que no hubo crecimiento de colonias bacterianas alrededor de las puntas de gutapercha con clorhexidina en las cepas estudiadas, formando un halo de inhibición para el *E. faecalis* de 6.16 mm (media aritmética). Para el caso del *F. nucleatum* el halo de inhibición tubo una media aritmética de 6.41 mm.

Se concluye que las puntas de gutapercha conteniendo Clorhexidina al 5% utilizadas como material de obturación temporal en el tratamiento de conductos necróticos en Endodoncia, inhibieron el crecimiento de cepas de *E. faecalis* y *F. nucleatum* por lo que se determinó un efecto bactericida.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la Endodoncia dentro del campo de la Odontología es el 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. Entre 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, por lo tanto necrosis pulpares 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 han encontrado con mayor frecuencia en infecciones endodónticas persistentes es el *Enterococcus faecalis*. Debido a que es una bacteria anaerobia facultativa, es resistente a la mayoría de medicamentos intraconducto que se utilizan normalmente. Además tienen la capacidad de adherirse dentro de los tubulillos dentinales aparentemente formando una película biológica (biofilm), lo cual hace 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 es el *Fusobacterium nucleatum*, que es un bacilo anaerobio estricto que 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 clorhexidina, con el objeto de aplicarlo eventualmente en la medicación de conductos radiculares entre citas 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, 10, 11, 12, 15, 27, 30, 34).

Las bacterias *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis* se han aislado de procesos infecciosos del sistema de conductos radiculares⁽¹²⁾. El *Enterococcus faecalis* es un coco Gram. (+) del grupo D anaerobio facultativo es un componente saprofítico de la flora entérica y no pertenece a la flora indígena 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, también existen estudios que sugieren que tiene la capacidad de formar una película biológica^(1, 2, 4, 11, 12, 15, 27, 30, 33). El *Fusobacterium nucleatum* es un bacilo Gram. (-) pleomórfico, inmóvil, no fermentativo, anaerobio estricto, posee una endotoxina en su pared celular capaz de producir respuesta a nivel periapical aún en pequeñas cantidades produciendo destrucción ósea. la combinación de ésta bacteria con *Peptoestreptococcus* incrementan el grado de destrucción periapical. Es común encontrarlo en los abscesos periapicales y se sabe que su hábitat primario es el surco gingival.

Estas bacterias cuando infectan el sistema de conductos endodónticos son tratadas utilizando medicamentos como Hidróxido de Calcio Ca(OH)_2 con diferentes vehículos^(10, 12, 15, 33, 34). Este medicamento 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^(11, 12, 13). Este actúa por contacto, pero si no se encuentra lleno todo el conducto su efectividad es cuestionable⁽¹²⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

JUSTIFICACIÓN

Debido a que varios Laboratorios Dentales fabrican diferentes materiales, en especial la casa Roeko, que está produciendo productos que sirven específicamente para medicar conductos radiculares necróticos. Este producto consiste en puntas de gutapercha conteniendo clorhexidina.

Se realizó esta investigación para comprobar el efecto bactericida de este material y considerarlo como una alternativa en la medicación del sistema de conductos radiculares en Endodoncia y a la vez los estudiantes de Odontología cuenten con otras técnicas que brinden un material de fácil manipulación.

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 ser 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, incurvada o espiralada ⁽²⁴⁾.

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

En 1890 Willoughby D. Miller publicó el libro "Microorganisms of the Human Mouth", 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 los conductos radiculares, Incluso en 1951. A. Knapp citó varios casos clínicos en los cuales pacientes con degeneración en la retina y ceguera se curaron con la extracción de 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. Este 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 extrabucuales se localizaban en las pulpas de piezas dentales 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, S. Stanley y Fitzgerald, en 1965. Estos investigadores no encontraron cambios patológicos en las pulpas expuestas o en los tejidos perirradiculares de ratas gnatobióticas. 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 peri radicular⁽³²⁾.

MICROBIOLOGÍA PULPAR:

Los microorganismos bucales son la causa más frecuente de infecciones pulpares las cuales son polimicrobianas con una predominancia de 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 han habido grandes avances en el conocimiento de la etiología y patogenia de las lesiones pulpares y periapicales.

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 la dentina expuesta en la superficie de la 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 y reversible. La exposición continua a los productos bacterianos afecta a los tejidos de la pulpa y desvitaliza a los que se encuentra debajo de los odontoblastos destruidos ⁽²⁴⁾.

Cuando la pulpa se extiende 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 afectar 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 periodontitis del adulto y de los conductos radiculares de los dientes con procesos periapicales.

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 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 (+), bacilos y cocos por medio de microscopía electrónica de transmisión ⁽²⁴⁾.

Recientemente se ha registrado un renovado interés por los microorganismos extrarradiculares. 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 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. Empero, 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 causar una rápida resorción ósea y un aumento del área radiolúcida. La progresión del proceso

70°C para que las dos cadenas de ADN se separen. A estas temperaturas tan elevadas la ADN polimerasa se inactiva 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 solo 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 pueden obtener hasta un millón de copias de una molécula de ADN ⁽⁸⁾.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que éstos 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, ARN muestran que los estreptococos del grupo D, *Enterococcus* y no *Streptococcus* pertenecen a diferentes géneros, por lo tanto, se ha propuesto que *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. casellflavus* sean reclasificados como miembros del género *Enterococcus* ^(16, 28).

Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, es fermentativo, no forma esporas (4, 16, 18). Las células de *Enterococcus faecalis* son esféricas u ovoides y de 0.5 a 1µm 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 ^(16,18).

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 ^(16, 18).

HABITAT

Los *Enterococcus* se encuentra aproximadamente en todos los animales (como en aves, reptiles, insectos), plantas. En el humano, son flora normal del tracto gastrointestinal (TGI), tracto genitourinario (TGO), 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 ^(16, 18).

FACTORES DE VIRULENCIA

Poco se conoce de 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. Gelatinaza
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, éstos son altamente resistentes a la terapia antimicrobiana, lo que explica el incremento de las infecciones enterococcicas en pacientes tratados previamente ⁽¹⁶⁾.

Su habilidad para producir enzimas que posiblemente podrían relacionarla a su mecanismo de patogenicidad ⁽¹⁶⁾.

ASOCIACIÓN DE *Enterococcus faecalis* CON INFECCIONES ENDODÓNTICAS

El *Enterococcus faecalis* ha mostrado ser altamente resistente una vez establecido en el sistema de conductos radiculares que puede mostrar un papel importante, en fracasos endodónticos ^(2, 4, 22).

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 más prevalente en fracasos endodónticos ⁽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 ^(1, 22).

Siren et al., mostró que las bacterias entéricas fueron cultivadas mas frecuentemente cuando los conductos no se sellaron entre cada sesión mientras que el número de sesiones se incrementaba y en casos de retratamientos. *Enterococcus faecalis* fue la más común de todas las bacterias, presentándose en casos de mono infección 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 del 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 ⁽¹⁾. Todas estas propiedades ayudan a explicar la alta prevalencia significativa de *Enterococcus faecalis* en fracasos endodónticos ^(12, 16, 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 ⁽¹⁸⁾.

Isabela N. Roças y col., realizaron un estudio acerca 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 asociados con lesiones periapicales crónicas asintomáticas ⁽²³⁾.

Estudios han revelado que el *Enterococcus faecalis* tiene la habilidad de penetrar los tubulillos dentinarios 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 ^(12, 16).

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium:

El género se incluye en la familia bacteroidaceae entre las especies que comprende se encuentran el *Fusobacterium nucleatum* ⁽¹⁶⁾.

Las fusobacterias son bacterias Gram negativas, 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 pleomorficas, no forman esporas, que aparecen como bacilos de a pares con apariencia de cigarro alargado. Son quimioorganotrópicas, metabolizando peptona o

carbohidratos pero en general solo 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 isobalonato. Algunas cepas son móviles a flagelos peritricos aunque la mayoría son inmóviles y no capsulados ⁽¹⁶⁾.

Estas bacterias fueron aisladas por primera vez junto con espiroquetas, en un caso de gingivitis Ulcerosa asociada a la infección conocida como Gingivitis ulceronecrotizante Aguda (GUNA) ⁽¹⁶⁾.

En la cavidad bucal se han tipificado dos especies de fusobacterias, a saber: *Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium periodonticum* ⁽¹⁶⁾.

F. nucleatum puede ser aislado con infecciones del tracto respiratorio superior de la cavidad bucal en lesiones periodontales ⁽¹⁶⁾.

CULTIVO

Crece en anaerobiosis a 35 y 36 °C. a pH de 7 en medio de agar- sangre con vancomicina. Son catalasa negativa; no reducen NO₃ a NO₂; no producen ureasas ⁽¹⁶⁾.

PARED CELULAR

Poseen LPS, con algunos de los componentes típicos presentes en las bacterias entéricas. No tienen cápsula ⁽¹⁶⁾.

MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Uno de los objetivos de la terapia endodóntica es la reducción o eliminación de las bacterias y sus productos por medio de la preparación quimiomecánica completa 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, 12).

Se ha recomendado ampliamente el uso de medicaciones intraconductos para desinfectar el sistema de conductos radiculares ⁽²⁾. Las razones para el uso de un medicamento intraconducto son:

- a. Para eliminar las bacterias en los conductos radiculares
- b. Para prevenir la proliferación bacteriana entre citas
- c. Para actuar como una barrera físico-química previniendo la reinfección y suplementos bacterianos para las bacterias remanentes en los conductos radiculares ⁽¹²⁾.

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 los tejidos 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).

En la irrigación de los conductos radiculares se han utilizado ciertos fármacos como el gluconato de clorhexidina.

CLORHEXIDINA

La clorhexidina se presenta en tres formas: sales de digluconato, de acetato y de hidrocloreuro. La mayoría de los estudios y de las fórmulas y productos bucales usan el digluconato, que se fabrica en concentrados del 20% v/v. Las sales de digluconato y de acetato son solubles en agua, pero el hidrocloreuro de clorhexidina lo es muy poco. La clorhexidina fue desarrollada en la época de 1940 por Imperial Chemical Industries, Inglaterra y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel. Más adelante, el antiséptico empezó a utilizarse más ampliamente en medicina y cirugía, incluidas obstetricia, ginecología, urología y preparación prequirúrgica de la piel tanto para el paciente como para el cirujano. El uso en odontología, inicialmente, fue para desinfección de la boca y en endodoncia. La inhibición de la placa por la clorhexidina fue primero investigada en 1962 (Schroeder, 1969), pero el estudio definitivo fue realizado por Løe y Schiott (1970). Este estudio demostró que un enjuague de 60 segundos, dos veces al día, con 10 ml de una solución de gluconato de clorhexidina al 0.2% (dosis de 20 mg) en ausencia del cepillado dental normal, inhibía la neoformación de la placa y el desarrollo de gingivitis, tantos estudios siguieron a esos que la clorhexidina es hoy uno de los compuestos mas investigados en la odontología ^(19, 36).

La clorhexidina es un compuesto bisbiguanido de molécula simétrica, compuesta de dos anillos clorofenólicos y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno.

Este compuesto es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH más de 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno (Albert y Sergeant, 1962). Por cierto, es la naturaleza dicatiónica de la clorhexidina la que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo cual es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultades para formularla en los productos ^(19,36).

El gluconato de clorhexidina, es una polibiguanida catiónica, es una droga antiséptica y antimicrobiana con propiedad bactericida. A un pH fisiológico, las sales de clorhexidina se disocian liberando un componente cargado positivamente. Esta molécula catiónica se liga a la pared de los microorganismos, que tiene carga eléctrica negativa. A concentraciones menores, este proceso altera el equilibrio osmótico celular, produciendo pérdida de iones intracelulares como potasio y fósforo; este efecto es bacteriostático. A concentraciones mayores se produce un efecto bactericida causando precipitación o coagulación del citoplasma microbiano y muerte celular ⁽¹⁹⁾.

La clorhexidina es eficaz contra una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, fermentos, hongos dermatofitos y virus lipofílicos (p.e. virus del SIDA, herpes virus, citomegalovirus, influenza). Es inactiva contra las esporas bacterianas, excepto a altas temperaturas, y contra *Mycobacterium tuberculosis*. Su espectro de acción incluye a *Staphylococcus aureus*, el germen causal más frecuente de heridas y quemaduras ⁽¹⁹⁾.

Ciertas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* son menos susceptibles a cetrimida, por lo que se requieren concentraciones mayores para conseguir una acción bactericida eficaz ⁽¹⁹⁾.

La clorhexidina es un fármaco que se ha utilizado desde hace varios años en la odontología como un importante antiséptico para el control de los microorganismos causantes de la caries dental y de otras patologías relacionadas con los tejidos de soporte (periodontitis) para estos efectos esta se ha utilizado en bajas concentraciones (0.12%) ^(19, 36).

Actualmente se ha propuesto el uso de clorhexidina para la irrigación de los conductos y se han realizado varios estudios en los que se ha demostrado su efectividad en la eliminación de los microorganismos allí presentes, pero utilizándose a mayor concentración (2%) ^(19, 36).

Según Michael J. Jeansonne (1994), la clorhexidina posee muchas propiedades: es de amplio espectro, tiene una actividad residual extendida (sustantividad) y una relativa ausencia de toxicidad. Todas estas propiedades la sugieren como un irrigante para la terapia endodóntica. Actualmente el irrigante de elección más común es el hipoclorito de sodio, pero, a su parecer este tiene ciertas desventajas como su acción cáustica y que puede desteñir los artículos operatorios ^(19, 36).

B.J. Lente (2000), igualmente propone a la clorhexidina como un irrigante ya que según su investigación puede desinfectar los túbulos dentinales y al mismo tiempo ser absorbida por la dentina, pero, concluye que se pueden tener mejores resultados usándola como una medicación intraconducto por varios días ⁽¹⁹⁾.

“El antibiótico activo de clorhexidina se basa en la absorción sobre la pared celular microbiana causando una microfisura en los componentes intracelulares y muerte celular. La clorhexidina es bactericida por la concentración usada, especialmente en los tratamientos endodónticos. El rol potencial de la clorhexidina en endodoncia ha sido enfatizada por varios investigadores, el interés específico es la propiedad antibiótica adquirida por la dentina radicular al absorber el fármaco; esta propiedad antibiótica puede darse luego de una irrigación prolongada del conducto usando de 0.2% hasta 2% de concentración de clorhexidina”. B. J. Lente ⁽¹⁹⁾.

Richard Komorowski (2000), estudió la sustentividad (actividad residual extendida) que crea la clorhexidina al ser utilizada como fármaco intraconducto, básicamente complementó estudios anteriores, ya que las investigaciones hechas por Jeansonne y Lenet referían que para obtener efectos superiores debía tener mayor tiempo de actividad el fármaco dentro del conducto. Komorowski llevó a cabo la investigación y observó que la infección causada por *E. faecalis* fue incapaz de colonizar el túbulo dentinal por 21 días después que la raíz fue tratada con clorhexidina por 7 días. Esto confirma que el potencial antimicrobiano de la clorhexidina se extendió al menos tres veces ⁽¹⁹⁾.

“Puede especularse que el potencial antimicrobiano adquirido por la raíz dental después del tratamiento con clorhexidina inhibe la infección del conducto posterior al tratamiento. El efecto de la

clorhexidina puede extenderse varios períodos, pero la duración de éste no se conoce. El resultado de este estudio demostró que el efecto antimicrobiano de clorhexidina en raíces de bovinos fue efectivo aún después de tres semanas ^(19, 36).

Las investigaciones realizadas por Jeansonne, Lenet y Komorowski acerca de la clorhexidina coinciden en que la propiedad más importante que posee es la capacidad antibiótica que le confiere a la dentina radicular debido a su fácil absorción a través de los túbulos dentinales. Lo que los hace diferir un poco el tiempo de actividad que debe tener la clorhexidina para que produzca este efecto y por cuanto tiempo se extiende su acción ^(19, 36).

Farmacocinética:

Los estudios realizados en animales y humanos han demostrado que la clorhexidina es poco absorbida por el tracto gastrointestinal. Después de dosis de 300 mg de clorhexidina en seres humanos, los niveles en plasma promedio de gluconato de clorhexidina alcanzaron un pico de 0.206 mg/g de plasma después de 30 minutos. No se encontraron niveles detectables de clorhexidina en el plasma de estos sujetos 12 horas después de administrar el compuesto ⁽¹⁹⁾.

Debido a su naturaleza catiónica, la clorhexidina se enlaza fuertemente a la piel, mucosas y otros tejidos razón que explica su muy pobre absorción. Después de su ingesta oral o administración percutánea, no se han encontrado niveles plasmáticos detectables ⁽¹⁹⁾.

La cetrimida es fuertemente catiónica por naturaleza, enlazándose firmemente a las estructuras cutáneas y de otros tejidos, por lo que, de igual manera, su absorción es mínima. Por lo tanto, no se ha descrito toxicidad sistémica por aplicación tópica o ingestión ni hay evidencias de teratogenia en el modelo animal. Incluso la infusión endovenosa en animales es bien tolerada y ha ocurrido accidentalmente en seres humanos sin consecuencias graves. Se detectaron reacciones de hipersensibilidad, incluido la anafilaxia en menos del 10 % de las personas en Japón, y fueron el resultado de la aplicación de productos de clorhexidina no registrados en sitios fuera de la boca. Fue insuficiente la información para confirmar si las reacciones fueron verdaderamente debidas a la clorhexidina. Se puede producir sordera neurosensorial si se introduce clorhexidina en el oído medio y no se debe colocar este antiséptico en el oído externo en caso de estar perforado el tímpano ^(19, 36).

El uso bucal a largo plazo produjo un leve desplazamiento de la flora hacia microorganismos más sensibles ⁽¹⁹⁾.

Usado como culotorio, la clorhexidina tiene varios efectos colaterales locales (Flotra y cols., 1971), de los cuales el más común y problemático es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo el dorso de la lengua. Los mecanismos sugeridos para la pigmentación por la clorhexidina aún están siendo debatidos (Eriksen y cols; 1985; Addy y Morán. 1995), pero han sido propuestos:

- degradación de la molécula de clorhexidina liberando paracloranilina.
- catálisis de las reacciones de Maillard
- desnaturalización proteínica con formulación sulfurosa metálica.
- precipitación de cromógenos dietéticos aniónicos ⁽¹⁹⁾.

La clorhexidina tiene un gusto amargo que es difícil de enmascarar y en muchas personas causa alteración del gusto ⁽¹⁹⁾.

Parece afectar sobre todo el gusto por lo salado lo cual hace que la comida se sienta sosa. Menos comúnmente, la clorhexidina causa erosión de la mucosa y esto parece ser idiosincrático con el antiséptico ejerciendo efectos letales sobre las células epiteliales superficiales en algunas personas. Este efecto colateral depende de la concentración y habitualmente puede ser controlada con culotorios de doble dilución ⁽¹⁹⁾.

La excreción del gluconato de clorhexidina después de la administración oral se produce principalmente en las heces (aproximadamente 90%) y menos del 1% de la clorhexidina fue excretada en la orina ⁽¹⁹⁾.

Los microorganismos con alta susceptibilidad a la clorhexidina incluyen algunos *Staphylococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Selenomonas* y *bacteria propiónica anaerobios* ⁽³⁶⁾.

El *Streptococcus sanguis* tiene una susceptibilidad moderada ⁽³⁶⁾.

INSTRUCCIONES DE USO DE LAS PUNTAS DE GUTAPERCHA CON CLORHEXIDINA SEGÚN EL FABRICANTE

Roeko, ACTIV POINT®

DEFINICIÓN

Activ Point® de Roeko son preparados con efecto de depósito, que liberan diacetato de clorhexidina a partir de una matriz de gutapercha.

COMPOSICIÓN:

Activ Point® están compuestas por diacetato de clorhexidina (aprox. 5%), gutapercha. Oxido de Zinc. Sulfato de Bario y pigmentos colorantes.

CAMPOS DE APLICACIÓN:

- Para la obturación temporal del canal radicular con clorhexidina como protección para una reinfección.
- Para tratamientos endodónticos de urgencia.

PROPIEDADES:

La punta está lista para el uso y tiene una forma estable a pesar de su flexibilidad para su fácil aplicación, también en conductos radiculares curvados. El diacetato de clorhexidina está incorporado en su forma pura de forma homogénea en la matriz portadora de gutapercha. Las puntas cumplen con las normas ISO, presentan medidas exactas y son naranjas, para evitar una confusión con las puntas de hidróxido de calcio o de gutapercha.

LIBERACIÓN DE CLORHEXIDINA:

El diacetato de clorhexidina se disuelve en el líquido que fluye inmediatamente después del secado por los conductos de dentina y a región del ápice al conducto radicular. La administración compacta del diacetato de clorhexidina en forma de puntas permite introducir cantidades suficientes de clorhexidina en el conducto radicular.

APLICACIÓN:

Activ Point® se elige según el tamaño del último instrumento para tratamientos radiculares utilizado, eventualmente un tamaño menor. La punta se marca a la longitud de trabajo y se maneja con las pinzas hasta llegar al ápice.

Debería colocarse de forma suelta y no debería condensar. Si el conducto no presenta una forma redonda regular, se pueden colocar otras puntas al lado de la primera punta. En la mayoría de los casos, la cavidad de acceso tiene un tamaño suficientemente grande para poder doblar simplemente el extremo de la punta. Esto facilita también la retirada de la misma.

La cavidad de acceso puede ser cerrada con cualquier material habitual.

DURACIÓN DE LA APLICACIÓN:

Debido a la estructura de la matriz de gutapercha, la superficie de la punta desprende en primer lugar cantidades relativamente grandes de diacetato de clorhexidina. Las capas dispuestas a mayor profundidad se desprenden más lentamente. La clorhexidina tiene una afinidad respecto a dentina por lo que está disponible durante períodos de tiempo relativamente largos. Las duraciones de la aplicación recomendadas varían entre una y tres semanas. Después se debería proceder a un cambio del relleno temporal o se debería proceder al relleno definitivo del canal radicular. En caso de una indicación clínica correspondiente, la punta debería cambiarse, no obstante, en intervalos más cortos (después de 2 a 3 días).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

RETIRADA DE ACTIV POINT® DE Roeko:

La liberación del diacetato de clorhexidina en el medio acuoso no influye en la estabilidad de la punta. Sigue teniendo una forma estable, también después de una duración de aplicación relativamente larga, pudiendo ser retirada con facilidad. La Activ Point® puede ser retirada con pinzas o con una sonda.

EFFECTOS SECUNDARIOS:

Al entrar en contacto con la mucosa bucal raramente se puede producir una irritación o una alteración de la sensación gustativa los dos síntomas desaparecen después de poco tiempo.

También es posible que se produzca un teñido marrón reversible del canal radicular.

CONTRAINDICACIONES:

En caso de que exista una alergia conocida contra clorhexidina, no se deben aplicar Activ Point®.

INTERACCIONES:

Con hipoclorito sódico y alcohol que se utilizan durante y después de la eliminación del tejido pulpar o del contenido infectado del conducto para el lavado, pueden surgir efectos sinérgicos en caso de utilizar clorhexidina. Estos pueden conducir a un mayor efecto inicial, que no alberga peligro alguno. Por lo tanto, las puntas se pueden introducir sin peligro también en un conducto radicular no completamente secado.

MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN:

- De un solo uso.
- Para el uso exclusivo por dentistas.
- Conservar en un lugar seco, a menos de 25°C.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto bactericida “*in vitro*” de las puntas de gutapercha con clorhexidina sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

ESPECÍFICOS

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

VARIABLES

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

Variables independientes:

1. Puntas de gutapercha con clorhexidina:
2. Cepas de *Enterococcus faecalis*.
3. Cepas de *Fusobacterium nucleatum*.

Variables dependientes:

1. Efecto bactericida.
2. Tiempo de efectividad.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES:

1. Puntas de gutapercha con Clorhexidina: Son similares a las puntas de gutapercha convencionales y contienen un compuesto bisbiguanido, que es una droga antiséptica y antimicrobiana con propiedad bactericida.
2. Cepas bacterianas:
 - 2.1 *Enterococcus faecalis*: Es un coco Gram-positivo anaerobio facultativo, fermentativo, no forma esporas, asociado a infecciones endodónticas persistentes.
 - 2.2 *Fusobacterium nucleatum*: Es una bacteria Gram-negativa anaerobia estricta, no esporulada, con forma fusiforme. Frecuentemente se encuentra en infecciones endodónticas.
3. Efecto bactericida o efectividad: Capacidad de inhibición bacteriana.
4. Tiempo de efectividad: periodo que será medido en horas para observar bajo aplicación del material, el crecimiento de las bacterias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas o su eliminación medido por la zona de inhibición en milímetros.

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 Lic. Guillermo Carrillo.

Procedimientos de Laboratorio:

A continuación, se dará una descripción más detallada de cada uno de los medios de cultivo que se utilizaron para el presente trabajo de investigación.

A) Preparación de los Medios de cultivo:

A.1) Medio de cultivo CTA

Composición del CTA:

Ingredientes	g/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 por 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.

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

Instrucciones:

Se suspendieron 39 gramos en un litro de agua destilada. Se llevó a ebullición hasta su disolución completa. Se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 minutos luego se enfrió a 50°C y se agregó 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 asepticamente 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.

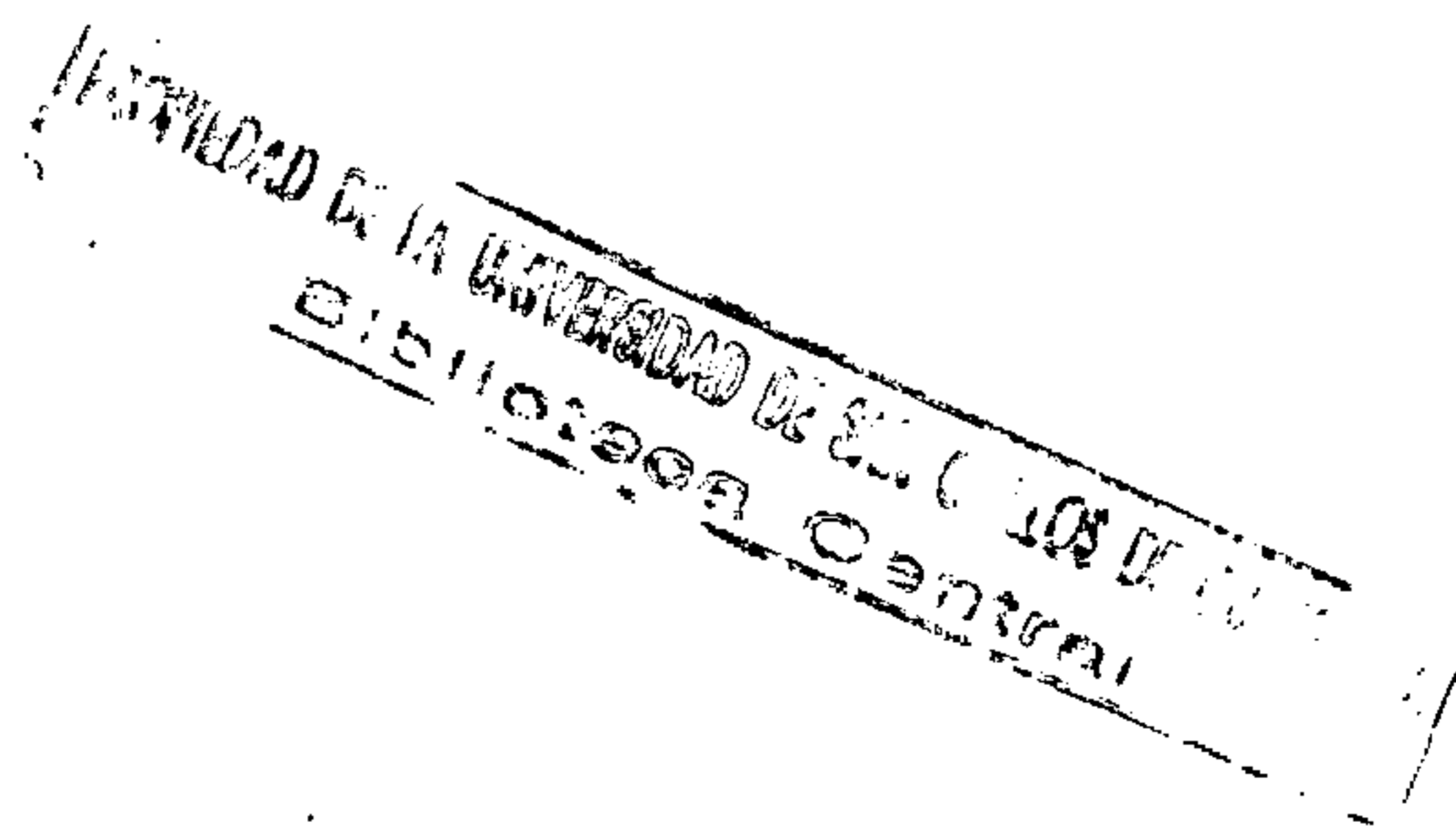
A. 3) El medio de Tioglicolato USP Código CM 173 es un medio para cultivo de agentes aeróbicos y anaeróbicos en pruebas de esterilidad.

Fórmula:	g/l
Extracto de levadura en polvo	5.0
Triptona	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 suspenden 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 realizará para la selección de bacterias *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922) y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

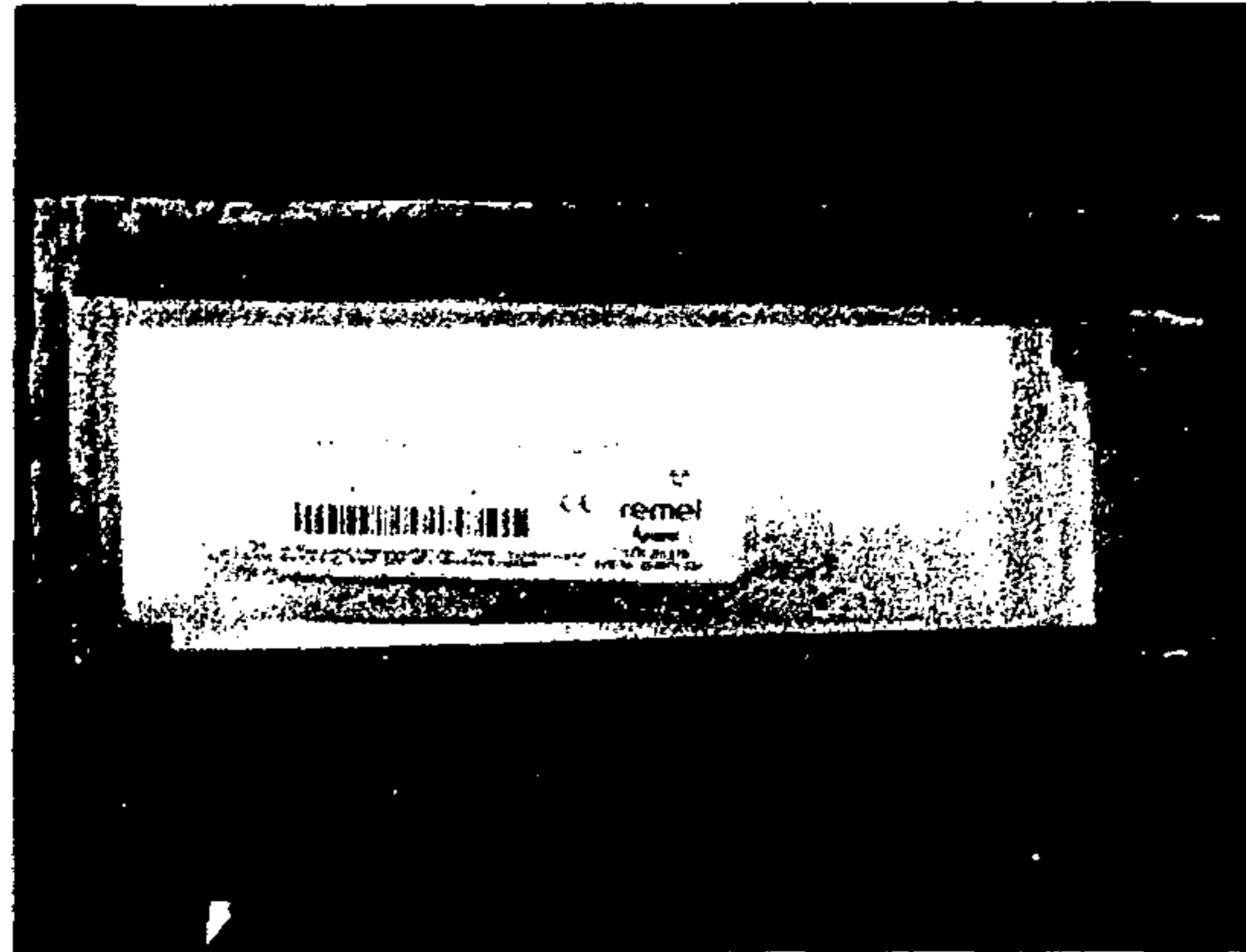
La investigadora con la ayuda del asesor de laboratorio obtuvo las cepas bacterianas (ver tabla No.2) que se necesitaron para el estudio de la siguiente manera:

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

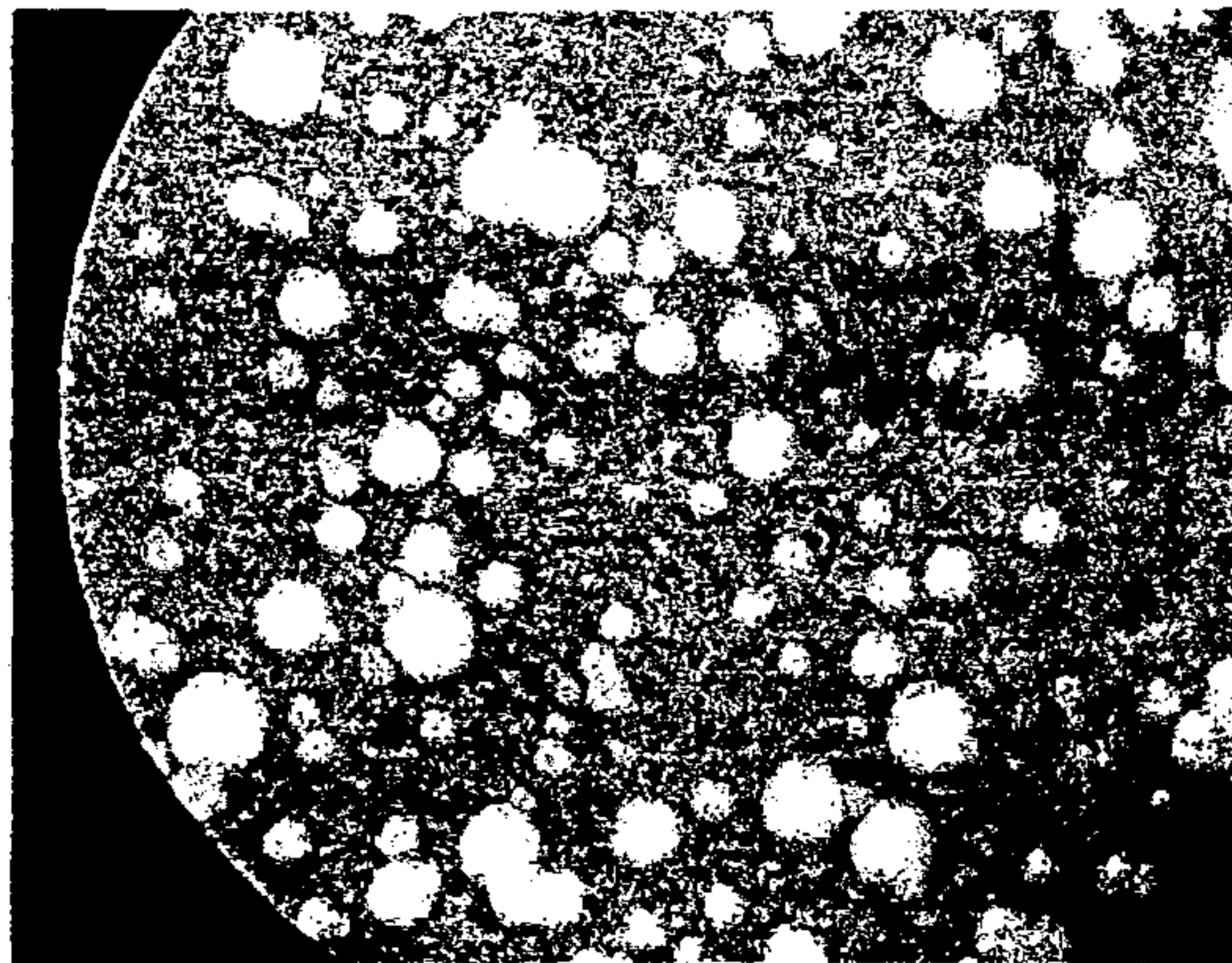


(a) colonias de *Enterococcus faecalis* en medio de cultivo agar sangre. Imagen vista desde el estereoscopio.

B.2) La muestra se obtuvo de Culti-loop (ver foto b), que contiene 5 asas de *Fusobacterium nucleatum*, se sembró en un medio de cultivo (Agar Chocolate) que es uno de los medios que se utilizan en bacterias anaerobias estrictas (ver foto c).

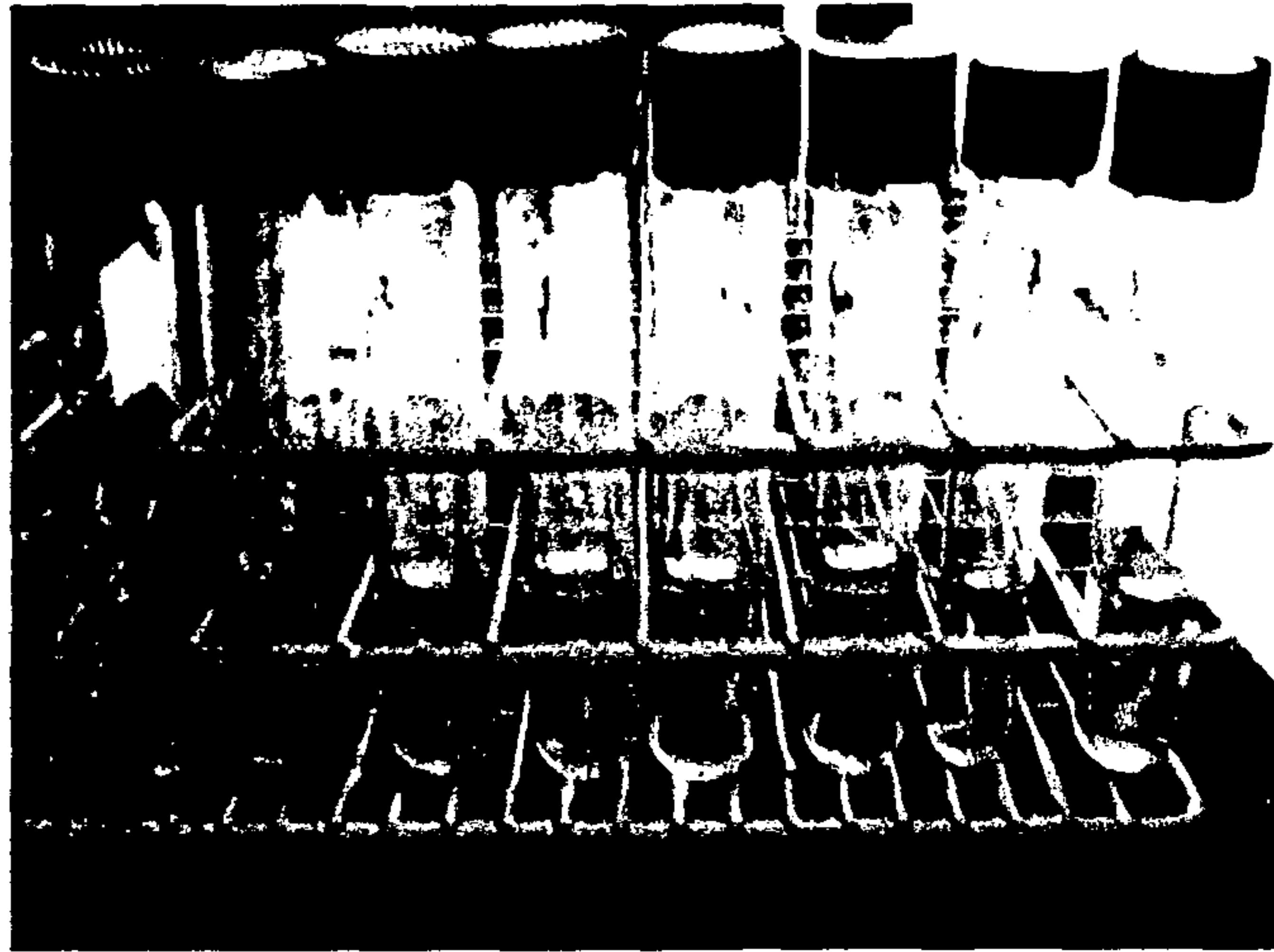


(b) Sobre metálico que contiene el asa microbiológica.



(c) Colonias de *Fusobacterium nucleatum* en el medio de cultivo agar chocolate. Imagen vista desde el estereoscopio.

B.3) Para observar efectividad la suspensión de bacterias se introdujo en un caldo enriquecido (Tioglicolato) según los estándares de Mac Farland, la cepa que se utilizó fue *Enterococcus faecalis* ATCC 25922 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (ver foto No d).

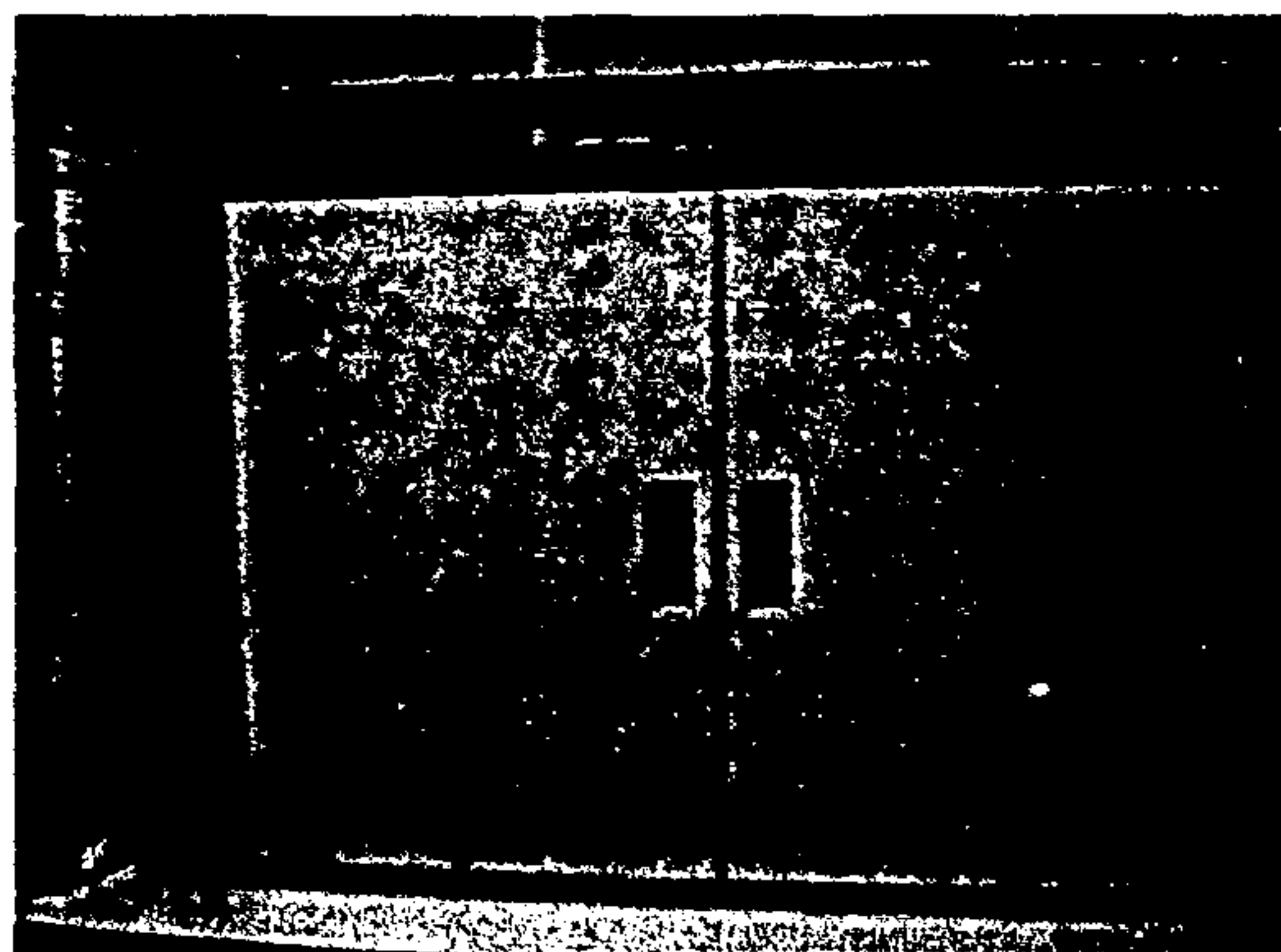


(d) suspensión de colonias bacterianas en medio líquido de tioglicolato. Dentro de los tubos pueden observarse las puntas de gutapercha con clorhexidina.

C.) Inoculación de las bacterias en los medios de cultivo.

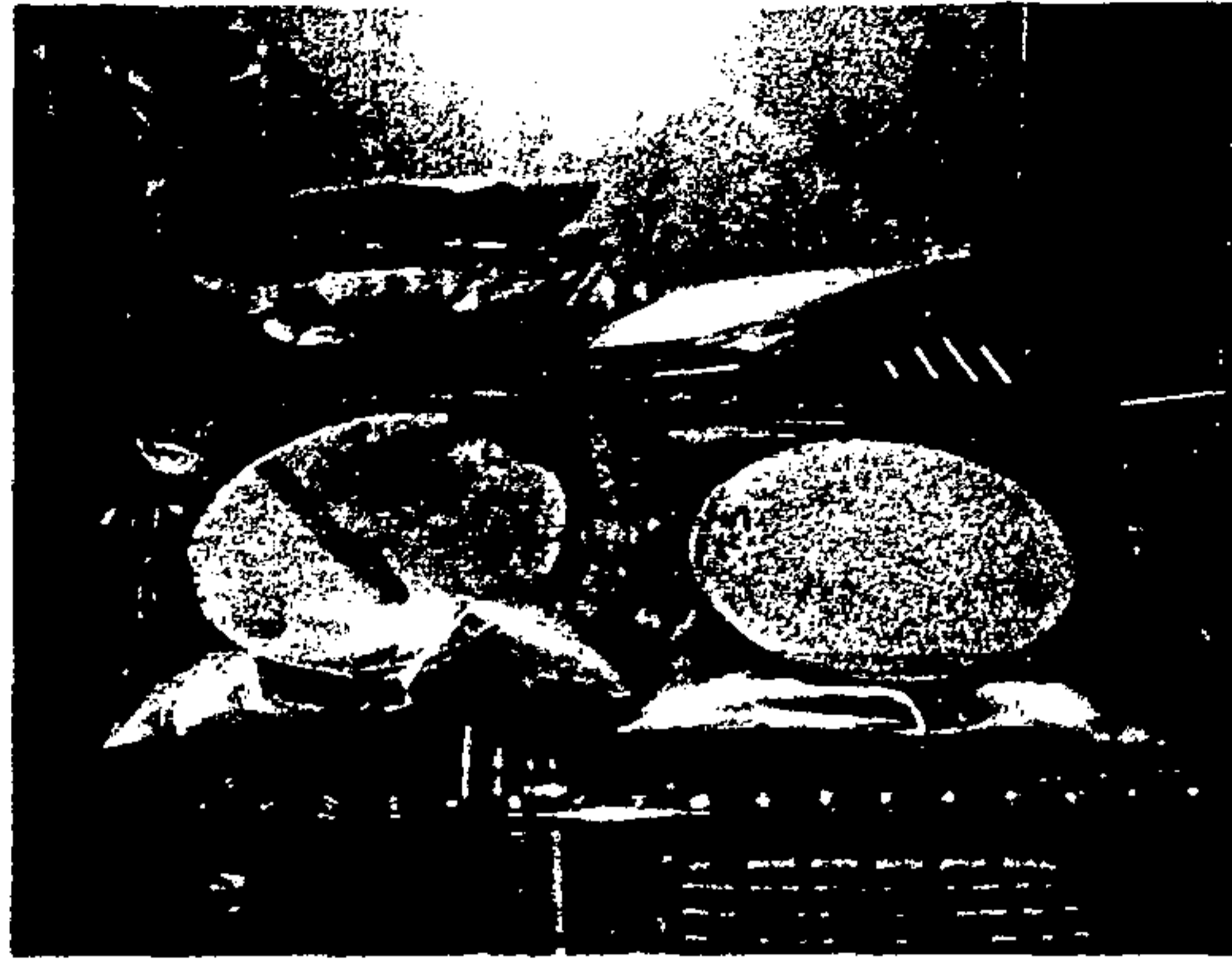
Con una asa se realizó la inoculación primaria del *Enterococcus faecalis* en el medio de cultivo. Utilizando dos asas flameadas se extendió la inoculación primaria aproximadamente dos centímetros, luego con otra asa se extendió el inóculo, y por último, con otra asa se hizo una tercera extensión del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

La caja de petri con agar sangre se incubó (ver foto e) en una atmósfera rica en CO₂ ambiente microaerofílico a una temperatura de 35°C, los cultivos se inspeccionaron después de 24 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 .



(e) Incubadora donde se introdujeron las cajas de petri con la siembra de *Enterococcus faecalis*.

La inoculación primaria del *Fusobacterium nucleatum* fue similar al procedimiento que se empleó con *Streptococcus faecalis*. Luego se colocaron 10 cajas de petri con la inoculación en una bolsa con ambiente anaeróbico (aerocult) con su respectivo indicador de anaerobiosis (ver foto f) se incubaron las cajas a 35°C durante 72 horas (ver tabla No 3).



(f) Las cajas de petri en un ambiente de anaerobiosis fueron introducidas dentro de la incubadora.

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

En el caso del *Fusobacterium nucleatum* fue necesario realizar la prueba de coloración de Gram para identificarlo (ver tabla No 4).

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 clorhexidina y los siguientes tubos de ensayo con las siguientes concentraciones de bacterias:

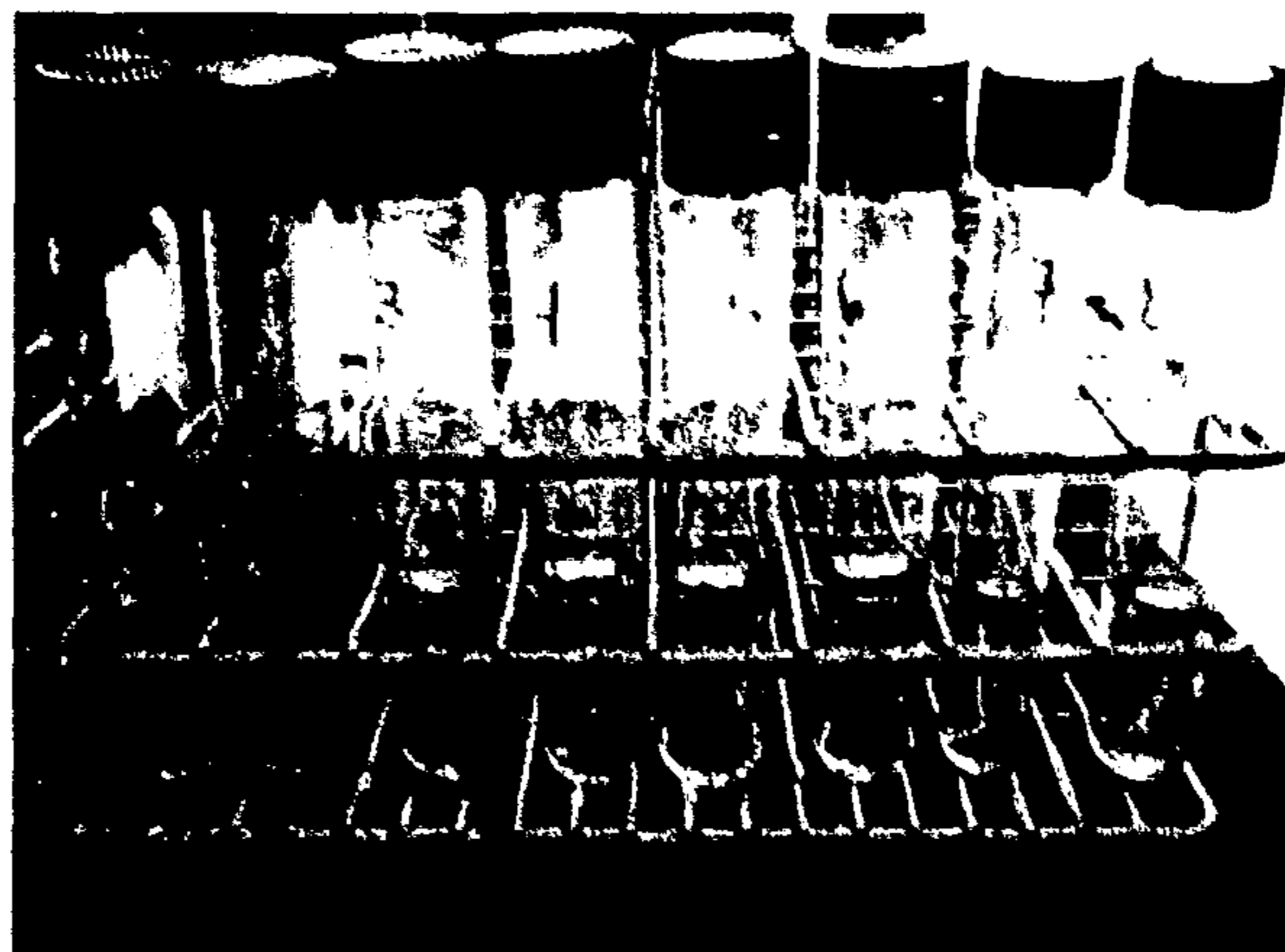
Tabla No. 1

Densidad celular de las distintas concentraciones de bacterias segun el método de Mac Farland

Tubo de ensayo	Concentración de bacterias	Densidad celular
No 3	0.25	0.75×10^8
No 4	0.5	1.5×10^8
No 5	1	3×10^8
No 6	1.5	4.5×10^8
No 7	2	6×10^8
No 8	3	9×10^8

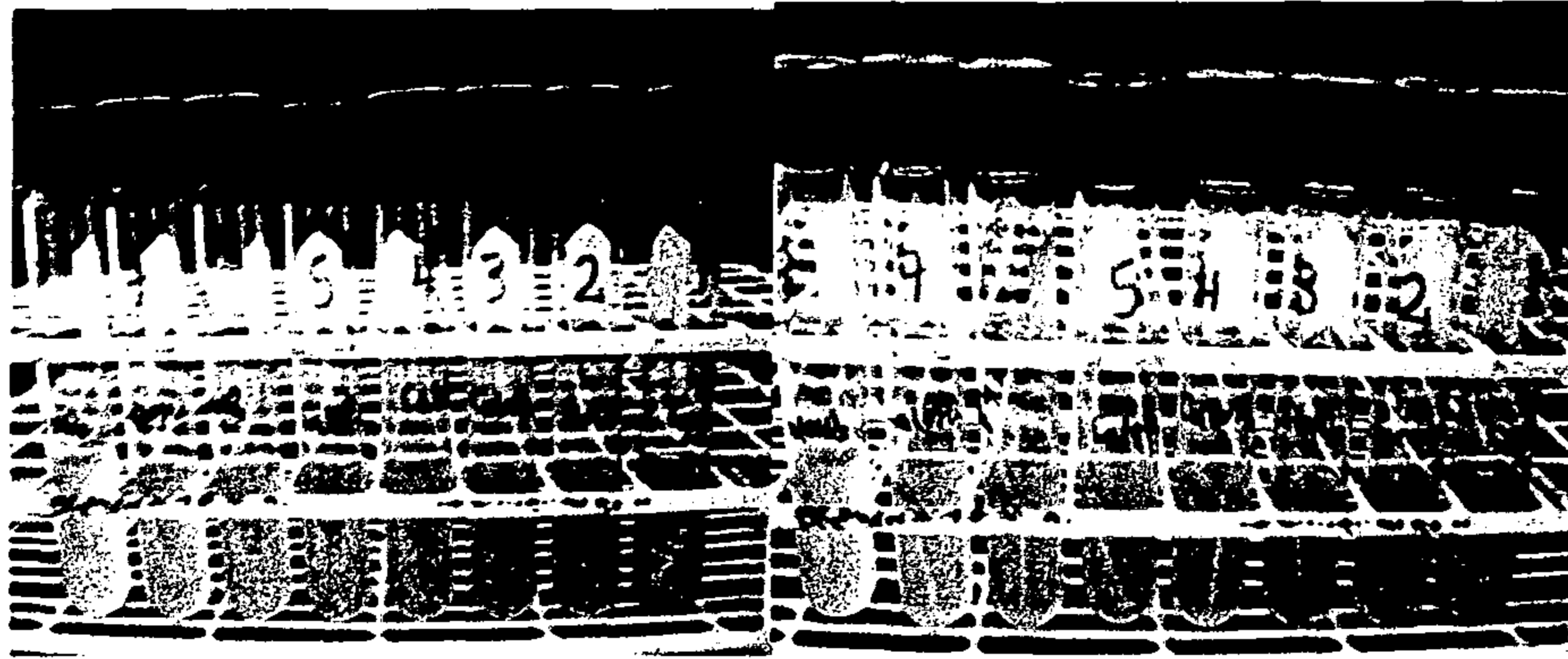
Fuente: trabajo de campo

C.2) En los diferentes tubos de tioglicolato con las distintas concentraciones de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* se les agregó las puntas de gutapercha que contienen clorhexidina y se incubaron durante 24 horas a 35°C.



(g) puntas de gutapercha con clorhexidina dentro del medio liquido de tioglicolato con la suspensión de bacterias.

1. En las 24 horas de incubación se evaluaron las diferentes concentraciones de bacterias en cada uno de los tubos (ver foto h, i).



(h,i) A las 24 horas de incubación se observó turbidez en los diferentes medios de tioglicolato.

D.) ANTIBIOGRAMA

Para observar la efectividad bactericida de las puntas de gutapercha con clorhexidina se evaluaron también con la técnica de difusión en agar (método de Bauer-Kirby), el cuál consistió en colocar las puntas en el medio sólido de agar Müeller Hinton) que estará inoculado con una suspensión de bacterias *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* al 0.5, 1, 1.5, 2, 3 basados en los estándares de Mac farland, en el cual se observó que si hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Para el *Fusobacterium nucleatum* se utilizó el agar Chocolate y se trabajó en una atmósfera de anaerobiosis, debido a que esta bacteria es anaerobia estricta.

Se preparó el agar Müeller-Hinton según las indicaciones del fabricante y con las siguientes características:

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

- Se guardaron 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.

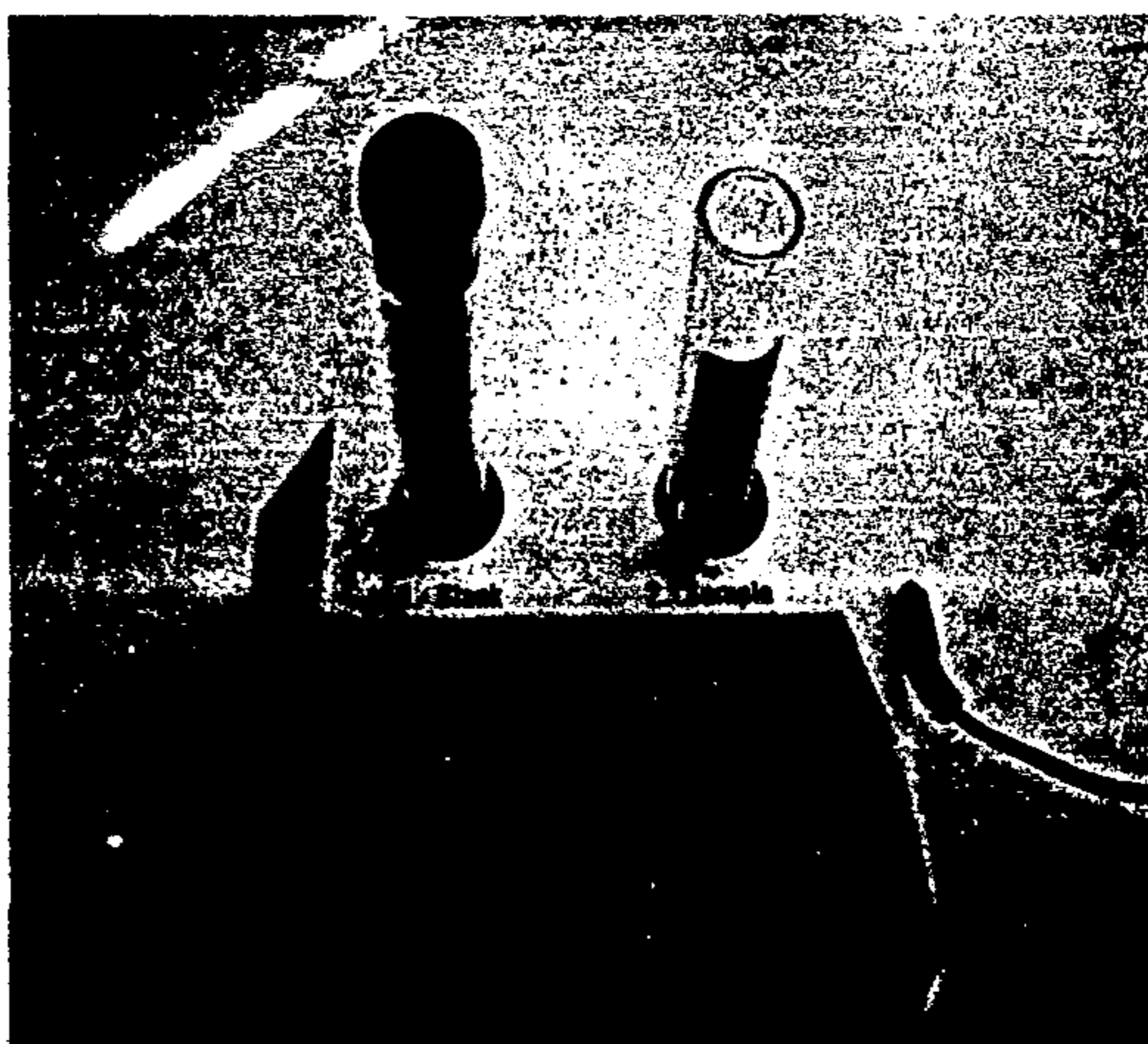
- Inmediatamente antes de usar el medio Müller-Hinton, se secó a 36°C, se colocaron las cajas en la incubadora por 20 minutos con el medio arriba y la tapadera ligeramente abierta.

Procedimiento:

El antibiograma se realizó de la siguiente manera:

- Con el asa flameada y fría se tomaron colonias bien aisladas y de igual morfología del cultivo original en cualquier medio sólido. Debe trasladarse siempre de un cultivo puro.
- Se Incubó el caldo por 24 horas a 36°C, hasta que se observó turbidez.

Se ajustó la turbidez a un estándar de Macfarland 0.5, 1, 1.5, 2, 3 (ver tabla No. 5), si el caldo es más turbio que el estándar agregarle más caldo de solución salina estéril. Comparar ambos tubos (muestra y estándar) con buena luz y frente a un fondo blanco. En este estudio se midió la turbidez de las distintas concentraciones de bacterias con la ayuda del turbidímetro. (ver foto j)

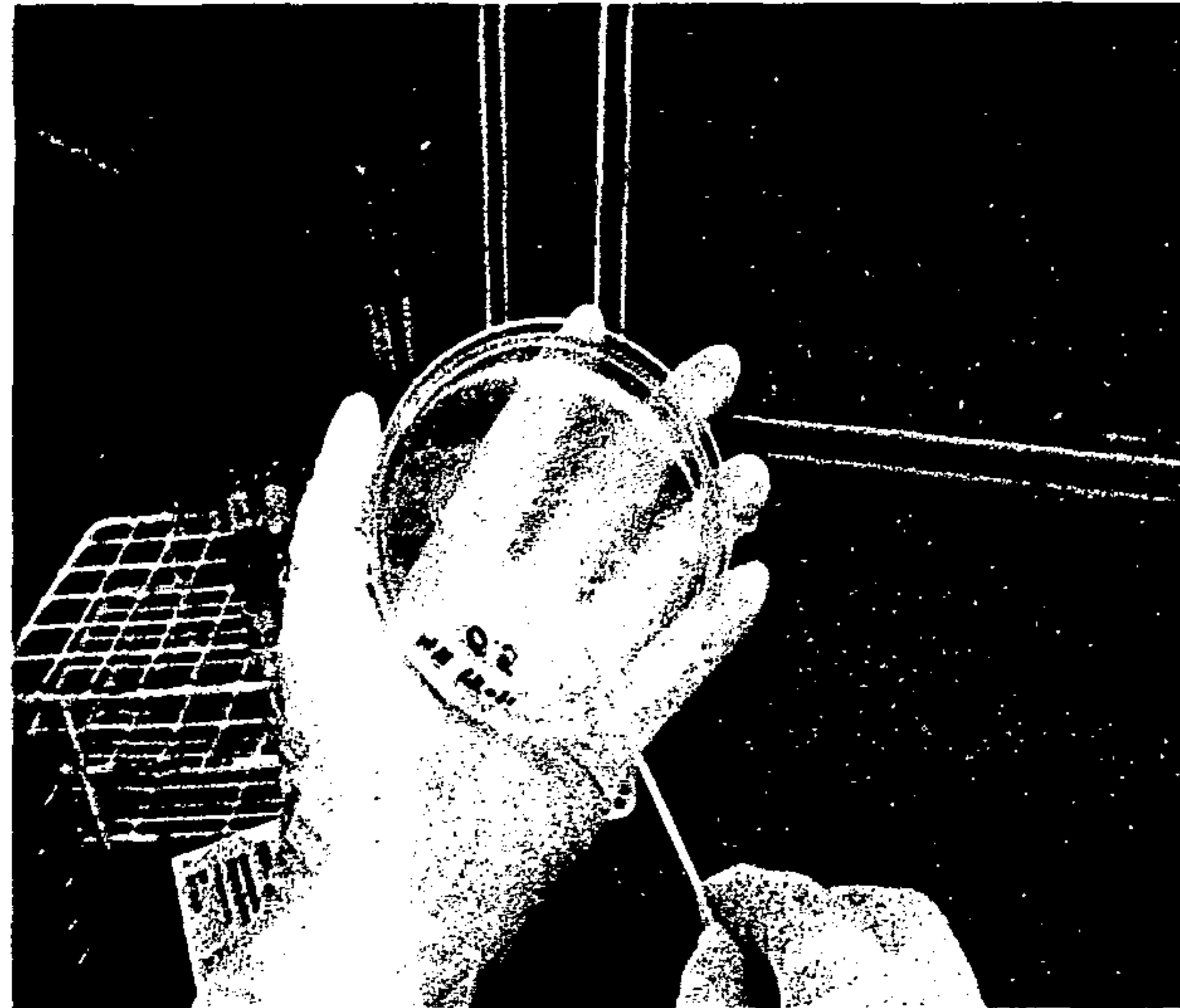


(j) Turbidímetro: se midió la turbidez de las distintas concentraciones de bacterias.

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

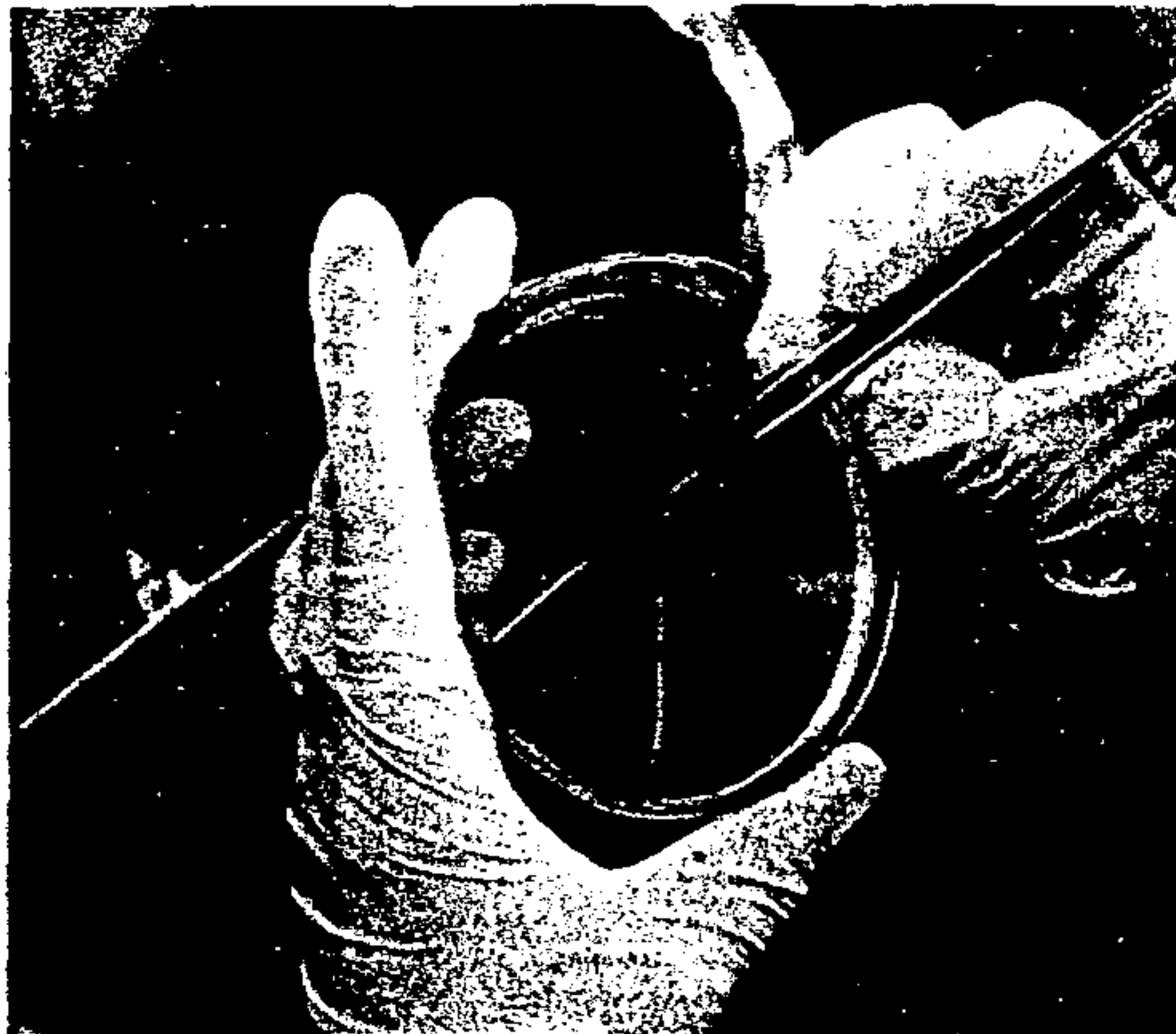
Con el hisopo exprimido se sembró la caja en tres direcciones opuestas sobre toda la superficie (ver foto k), cerca el mechero encendido. En caso de urgencia puede sembrarse la prueba directa, solo

si el frote Gram revela una sola clase de bacteria (LCR o secreciones varias), pero esto debe evitarse y considerarse preliminar. Se dejó secar la caja de 5 a 8 minutos, pero no más de 15 minutos con la tapadera cerrada.



(k) Siembra de *Enterococcus faecalis*

Con las pinzas estériles se colocaron las puntas sobre las bacterias estudiadas (ver foto l).

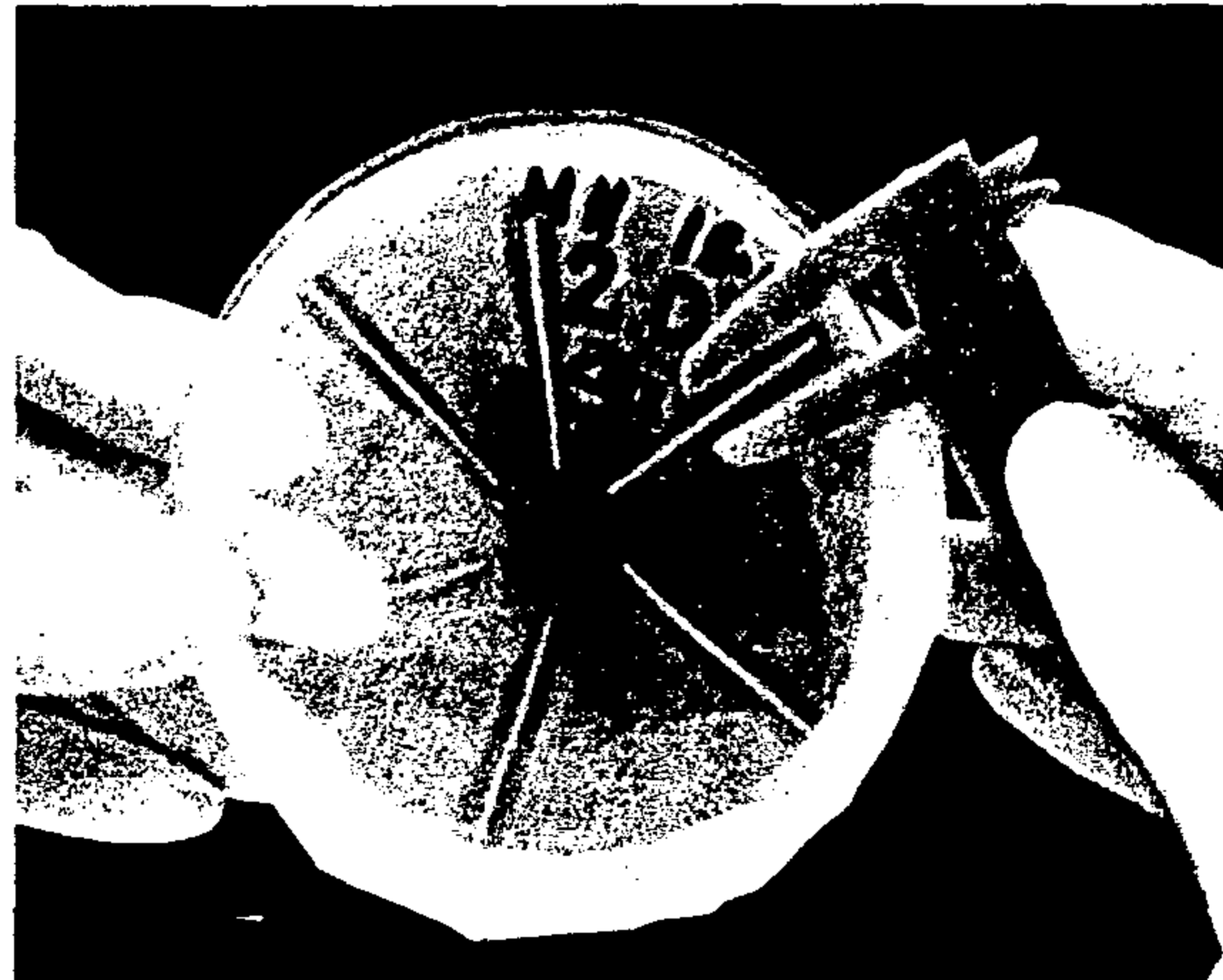


(l) Puntas de gutapercha con clorhexidina colocadas sobre la siembra bacteriana.

Las cajas se incubarán por 24 horas en el caso del *Enterococcus faecalis*, y 72 horas a la bacteria *Fusobacterium nucleatum*.

Interpretación de los resultados:

- Después de las 24 y 72 horas de incubación, se examinaron con buena iluminación todas las cajas en donde hubo crecimiento bacteriano.
- Se midió en mm el diámetro de las zonas de inhibición con un calibrador detrás de la caja de petri (ver foto m).



(m) Medicion de las zonas de inhibición con la ayuda de un calibrador.

- Para interpretar los resultados se utilizan las tablas de interpretación que son oficiales en Estados Unidos (NCCLS) y de los resultados como resistente, intermedio o susceptible.

Análisis Estadístico:

Para el presente estudio se utilizó el método estadístico descriptivo: el cual consiste en procesar y ordenar los datos obtenidos de los cuales se obtuvo la media aritmética.

DESCRIPCION DE LAS TABLAS (2-5)

Se realizó la siembra de las bacterias *E. faecalis* y *F. nucleatum* en los medios de cultivo agar sangre de carnero al 5% y agar chocolate respectivamente. Se incubaron a una temperatura de 35°C y un tiempo de incubación de 24 horas para la primera bacteria y 72 horas para la segunda bacteria (Ver tabla No.2).

Se realizó el antibiograma para las bacterias *E. faecalis* y *F. nucleatum* utilizando los medios de cultivo agar Müller Hinton y agar chocolate respectivamente, incubándose a una temperatura de 35°C para ambas bacterias y un período de incubación de 24 horas para la primera bacteria y 72 horas para la segunda bacteria (Ver tabla No. 3) .

En el cuadro No.3 se presentan los resultados de la preparación de la tinción Gram, para identificar *F. nucleatum* en los medios de cultivo (10). De ellos en cuatro medios de cultivos estuvo presente la bacteria. en el medio No.5 y 10 no hubo crecimiento, en los cuatro restantes no se observó presencia de *F. nucleatum* (Ver tabla No.4).

Se determinó la concentración de bacterias según el método de Macfarland, del cuál se obtuvo sus respectivos porcentajes: 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 (Ver tabla No.5)

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Tabla No.2

Condiciones y medios de cultivo a utilizar en la siembra bacteriana de *E. faecalis* y *F. Nucleatum*

Bacteria	Medio De Cultivo	Temperatura De incubación °C	Tiempo De Incubación	Ambiente
<i>E. faecalis</i>	Agar sangre de carnero al 5%	35°C	24 horas	Microaerofílico
<i>F. nucleatum</i>	Agar chocolate	35°C	72 horas	Anaerobio

Fuente: Trabajo de campo.

INTERPRETACIÓN

Medios De cultivo utilizados para las bacterias *E. Faecalis* y *F. Nucleatum* a temperatura de incubación de 35°C , tiempo de incubación de 24 y 72 horas respectivamente con un ambiente microaerofílico para la primera y anaerobio para la segunda bacteria.

Tabla No.3

Medios de cultivos empleados para realizar el antibiograma (Método de Bauer Kirby)

Bacteria	Medio de cultivo	T °C Incubación	Tiempo de Incubación	Ambiente
<i>E. faecalis</i>	Agar Müller Hinton	35°C	24 horas	Microaerofílico
<i>F. nucleatum</i>	Agar Chocolate	35°C	72 horas	Anaerobio

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.4

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

No. De cultivo	<i>F. nucleatum</i> presente
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 donde se incubo *F. Nucleatum* cuatro fueron positivas a la tinción de gram dos no presentaron crecimiento y en las cuatro restantes creció otra bacteria.

Tabla No.5

Concentración de bacterias medido en el turbidímetro

Turbidez (Dispersión de la luz)	Concentración de bacterias
0.12	0.5
0.24	1
0.36	1.5
0:48	2
0.72	3

Fuente: Trabajo de campo

INTERPRETACIÓN:

Se obtuvo los porcentajes de bacterias según las distintas concentraciones de bacterias para ser medidos en el turbidímetro.

RESULTADOS

Durante la evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha con clorhexidina sobre el *E. faecalis*, se ajustaron las distintas concentraciones de bacterias según el método de Mac Farland, utilizándose puntas de gutapercha con clorhexidina de calibres de 15, 20, 25, 30, 35 y 40.

Para la concentración bacteriana de 0.5 se observó un halo de inhibición con una media aritmética de 6.16mm.

La concentración de 1, el halo de inhibición presentó una media aritmética de 5.83mm.

En la concentración de 1.5 el halo de inhibición que se observó tuvo una media aritmética de 5.16mm.

La concentración de 2 el halo de inhibición tuvo una media aritmética de 4.66mm

La concentración de 3 el halo de inhibición tuvo una media aritmética de 4mm.

En general, el halo de inhibición formado presentó una media aritmética de 7.16 mm (Ver Cuadro No.1).

La evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha con clorhexidina sobre el *F. nucleatum* se realizó a las distintas concentraciones de bacterias según el método de Mac Farland. Se utilizó puntas de gutapercha con clorhexidina de calibres de 15, 20, 25, 30, 35 y 40.

La concentración de 1 presentó un halo de inhibición con una media aritmética de 6.66mm.

La concentración de 1.5 se observó un halo de inhibición con una media aritmética de 5mm.

Para la concentración de 2, el halo de inhibición formado presentó una media aritmética de 7mm.

Para la concentración de 3, se observó un halo de inhibición con una media aritmética de 7 mm.

En general, el halo de inhibición que se observó tubo una media aritmética de 6.41mm (Ver Cuadro No.2).

Cuadro No. 1

Evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha con Clorhexidina de la casa Roeko sobre cepas de *E. faecalis* en el medio de cultivo agar Müller Hinton.

Concentración de bacterias	Calibre de las puntas						\bar{X} Del halo de inhibición (mm)
	Halo de inhibición						
	15	20	25	30	35	40	
0.5	5mm	6mm	6mm	7mm	7mm	6mm	6.16mm
1	5mm	4mm	7mm	6mm	7mm	6mm	5.83mm
1.5	5mm	4mm	6mm	5mm	6mm	5mm	5.16mm
2	4mm	4mm	5mm	5mm	5mm	5mm	4.66mm
3	4mm	3mm	4mm	5mm	4mm	4mm	4.0mm
\bar{X} de halo de inhibición (mm)	4.6mm	4.4mm	5.6mm	5.6mm	5.8mm	5.2mm	

Fuente: Trabajo de campo

INTERPRETACIÓN:

El halo de inhibición encontrado es el resultado de la concentración de bacterias respecto al calibre de las puntas de gutapercha del cual se obtuvo la media aritmética.

Cuadro No.2

Evaluación del efecto bactericida de las puntas de gutapercha con Clorhexidina de la casa Roeko sobre cepas de *F. nucleatum* en el medio de cultivo agar chocolate.

Concentración de bacterias	Calibre de las puntas						\bar{X} Del halo de inhibición (mm)
	Halo de inhibición						
	15	20	25	30	35	40	
1	7mm	5mm	6mm	7mm	8mm	7mm	6.66mm
1.5	5mm	5mm	4mm	6mm	5mm	5mm	5mm
2	8mm	7mm	7mm	7mm	6mm	7mm	7mm
3	7mm	6mm	7mm	6mm	8mm	7mm	7mm
\bar{X} del halo de inhibición (mm)	6.75mm	5.75mm	6mm	6.5mm	6.75mm	6.5mm	

Fuente: Trabajo de campo

INTERPRETACIÓN:

El halo de inhibición encontrado es el resultado de la concentración de bacterias respecto al calibre de las puntas de gutapercha del cual se obtuvo la media aritmética.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio se realizó con el propósito de comprobar el efecto bactericida de las puntas de gutapercha con clorhexidina sobre cepas de *E. faecalis* y *F. Nucleatum*, en un estudio “*in vitro*”.

Con pruebas realizadas con una modificación de la técnica de difusión en agar (método de Bauer Kirby), se observó que las puntas de gutapercha con clorhexidina inhibieron el crecimiento del *E. faecalis* en las distintas concentraciones de bacterias, según el método de Mac Farland (0.5, 1, 1.5, 2 y 3), formando un halo de inhibición con una media aritmética de 7.16 mm de diámetro con respecto al calibre de las puntas (15,20,25,30,35y40), se observó que a menor concentración de bacterias mayor es el halo de inhibición formado, y a mayor concentración de bacterias menor es el halo de inhibición que se formó con un diámetro de 6.16mm para el primero y 4.0mm para el segundo.

Con respecto al calibre de las puntas se evidencio que el halo de inhibición no varió significativamente manteniéndose en un rango de 4.4 a 5.8mm de diámetro. La lectura de estas pruebas se realizó a las 24 horas (ver foto 1).

En las pruebas realizadas en agar chocolate por el método de Bauer Kirby se observó que las puntas de gutapercha con clorhexidina inhibieron el crecimiento del *F. nucleatum* al igual que el *E. faecalis*. Para esta bacteria se observó que el halo de inhibición, con respecto a la concentración de bacterias, varió significativamente manteniéndose en un rango de 5 a 7mm de diámetro; con referencia a los calibres de las puntas se observó que el halo de inhibición oscila entre 5.75 a 6.75 mm de diámetro; estas lecturas se realizaron a las 72 horas después de su incubación (ver foto 2).



Foto No. 1

Zona de inhibición formada por la punta de gutapercha con clorhexidina en las colonias de *Enterococcus faecalis*, vista desde el estereoscopio

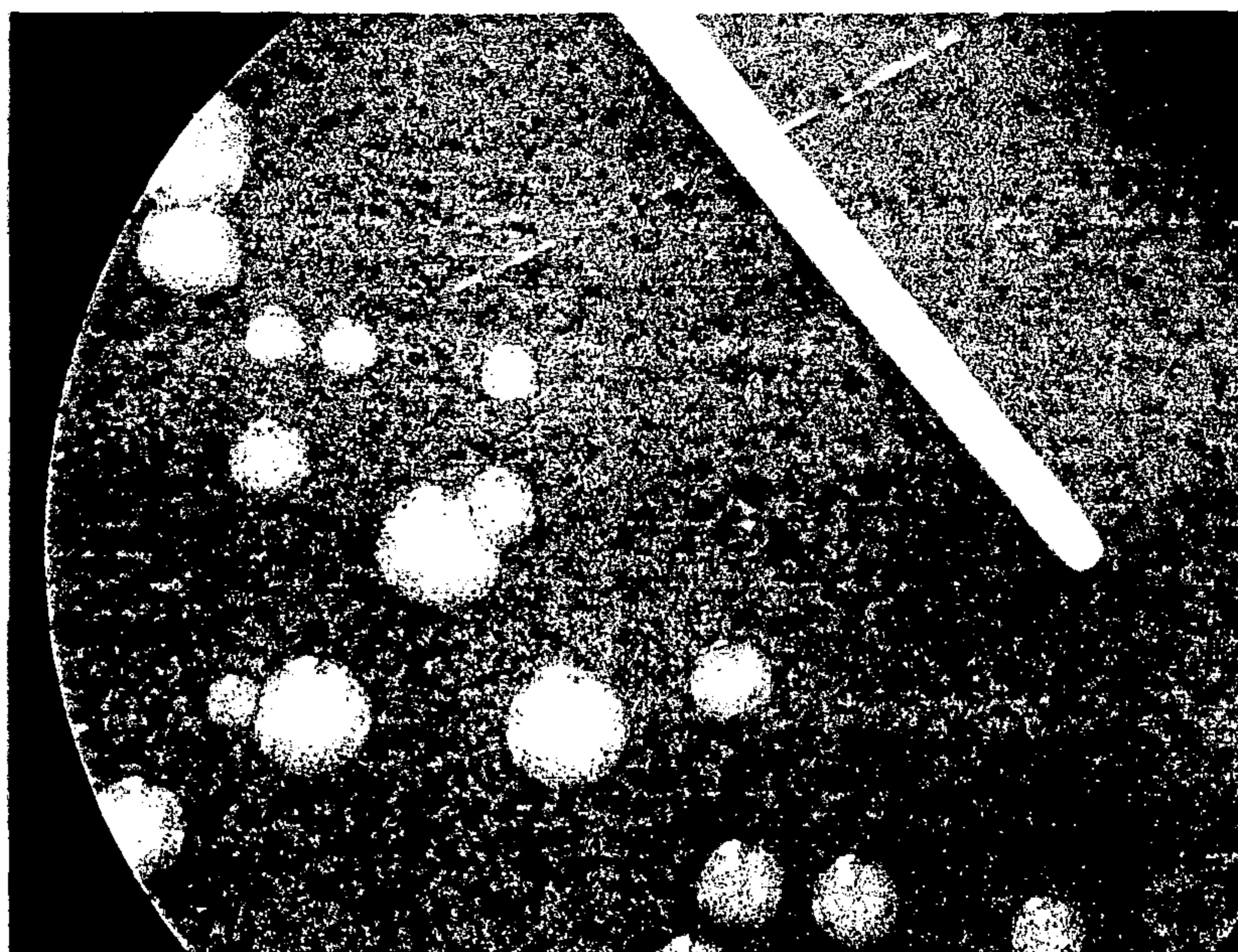


Foto No. 2

Zona de inhibición formada por la punta de gutapercha con clorhexidina en las colonias de *Fusobacterium nucleatum*, vista desde el estereoscopio.

CONCLUSIONES

En este estudio se concluye que:

1. Las puntas de gutapercha con clorhexidina inhibieron totalmente el crecimiento de *Enterococcus faecalis*. El halo de inhibición formado fue de 7.16mm.
2. Las puntas de gutapercha con clorhexidina inhibieron totalmente el crecimiento de colonias de *Fusobacterium nucleatum*, formando a su alrededor un halo de inhibición de 6.41 mm de diámetro.
3. El tiempo de efectividad de las puntas de gutapercha que contienen Clorhexidina no pudo evaluarse debido a que el caldo de tioglicolato está enriquecido con varios nutrientes que permiten que *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* se desarrollen y no se pudo observar el tiempo de efectividad.

RECOMENDACIONES

Con base en los hallazgos encontrados se recomienda:

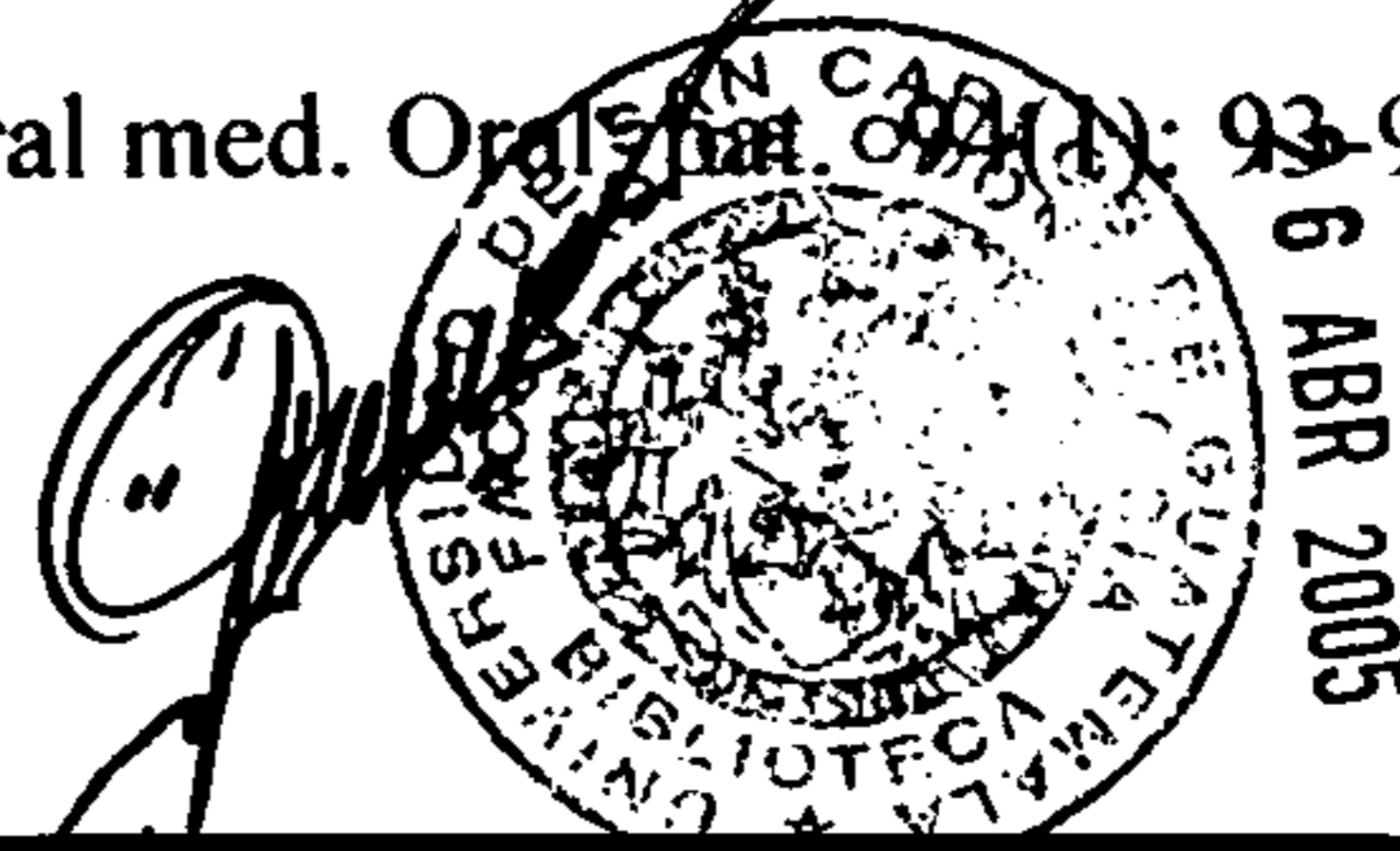
1. Se debe considerar como una opción en el tratamiento de medicación de los conductos radiculares el uso de las puntas de gutapercha con clorhexidina, puesto que su efectividad fue comprobada en los resultados que se obtuvieron "*in vitro*" utilizando las cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
2. Se recomienda que se realicen otras pruebas in vivo para dar respaldo a los estudios "*in vitro*" de las puntas de gutapercha con clorhexidina en tratamientos de conductos radiculares.
3. Es aconsejable realizar este estudio con otras cepas bacterianas que estén implicadas en los procesos infecciosos de la pulpa dental. Para comprobar si las puntas de gutapercha conteniendo clorhexidina al estar en contacto con estas bacterias son capaces de producir efecto bactericida.

LIMITACIONES

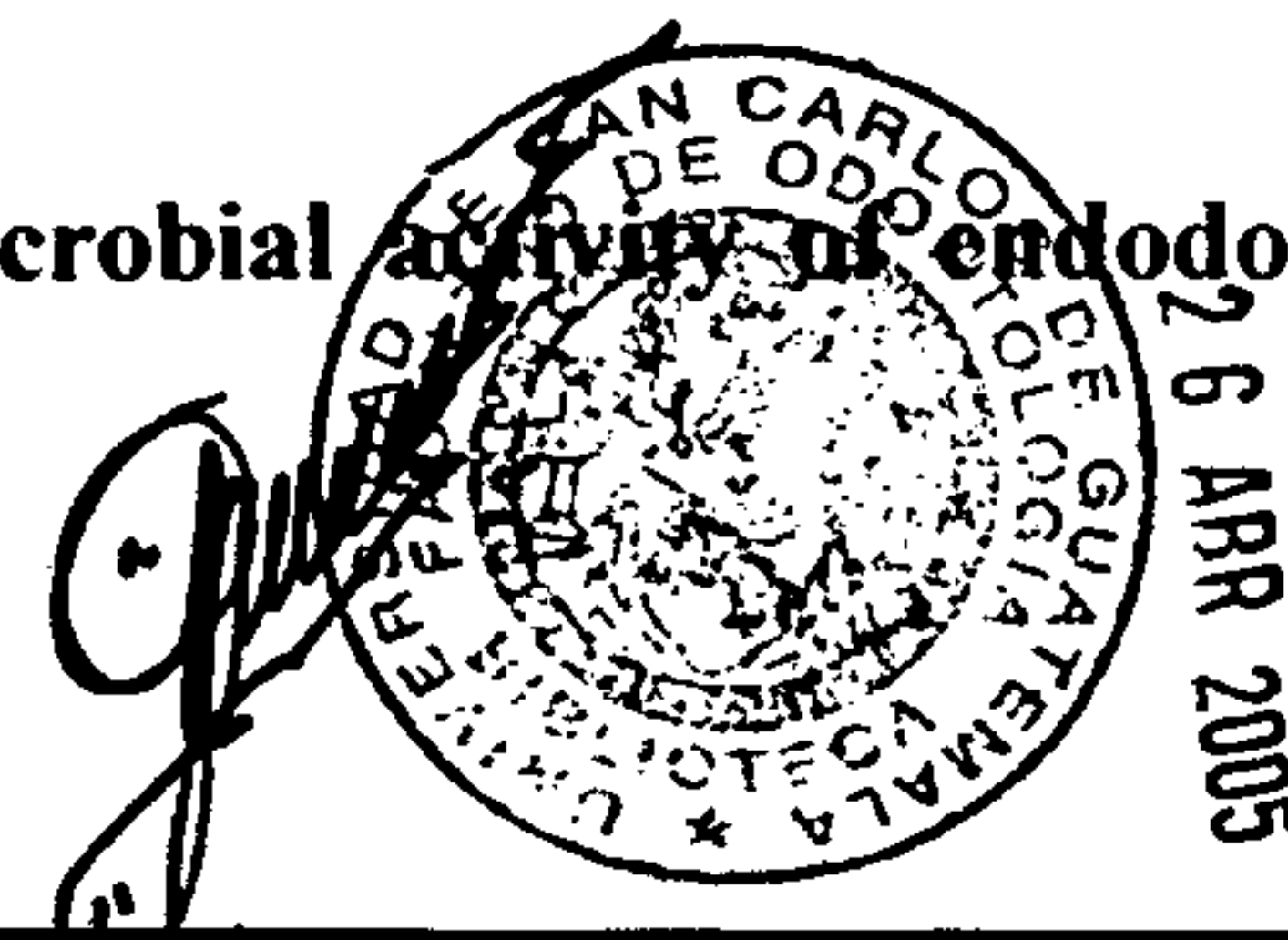
- El tiempo de efectividad no se pudo estandarizar por el método en medio líquido debido a que los caldos de tioglicolato están enriquecidos con varios nutrientes que hacen muy favorable el crecimiento de estas bacterias; su lectura fue posible únicamente a las 24 hrs. Por tal razón no fue posible evaluar las siguientes lecturas de cinco días, diez días y quince días.

BIBLIOGRAFIA

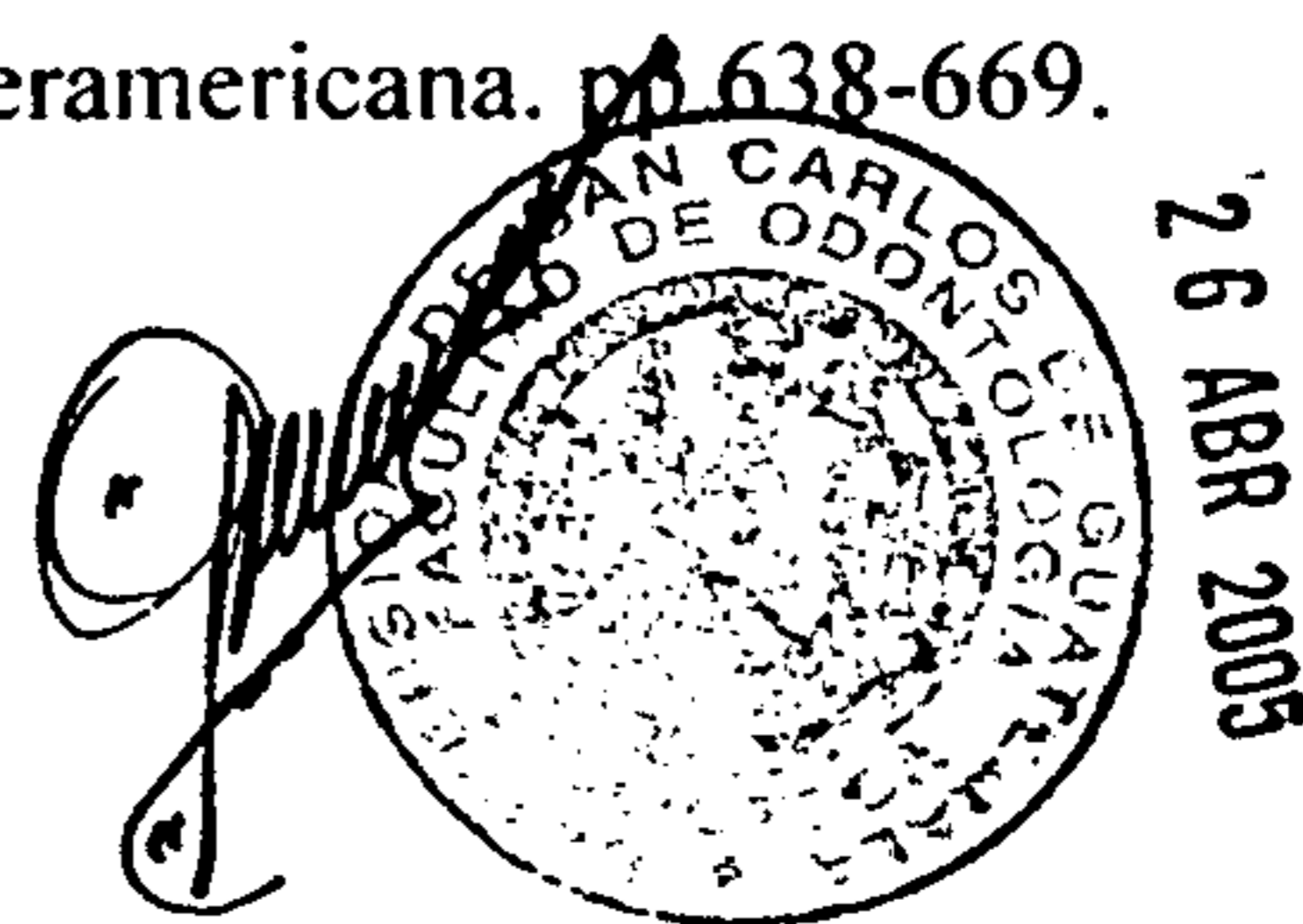
1. Almydouri, A. et al. (2002). **The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medication: an in vitro study.** J. of Endo. 28(2): 163-167
2. Al-Nazhan, S. (2002). **Antimicrobial activity of extracts of calcium hydroxide points.** Oral sur, Oral med, Oral pat. 93(5): 593-595
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 chlorhexidine-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. 93(4): 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. Estrela, C. y Figueiredo J. A. (1999). **Endodontia: principios biológicos e mecánicos.** Brazil : Artes Medicas. pp. 574-644.
13. _____ et al. (2002). **Root canal filling with calcium hydroxide using diferent techniques.** Brazzilian Dent. J. 13(1): 53-56.
14. Evans, M. D. et al. (2003). **Efficacy of calcium hydroxide: Clhorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin.** J. of Endo. 29(5): 338-345.
15. 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.
16. Holt, J. G. et al. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9 ed. Baltimore, E U A. : Williams & Wilkins. pp. 296, 528.
17. 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.
18. Lee, W. et al. (2004). **Sonicated extract of Enterococcus faecalis induces irreversible cell cycle arrest in phitohemaglutinin-activated human lymphocytes.** J. of Endo. 30(4): 209-212
19. Linde, J. et al. directores. (2001). **Periodontología clínica, e implantología odontológica.** Trad. Dr. Horacio Martínez 3 ed. Madrid, España: Médica panamericana. pp.480-486.
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 chlorhexidine 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 quantitative 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, type- 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 infections.** 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.
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.



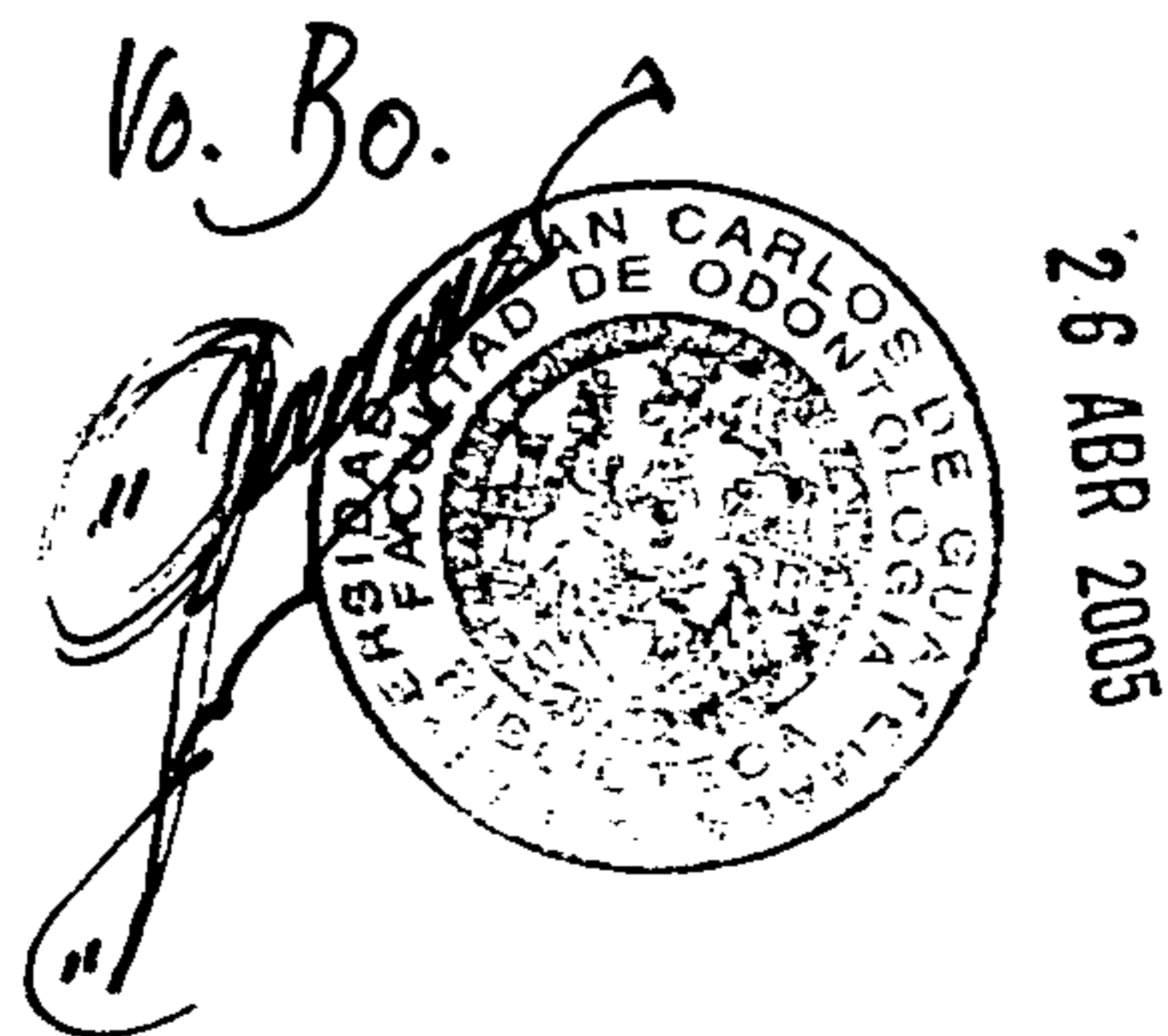
33.Sukawat, C. y Thanapen S. (2002). **A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with enterococcus faecalis.** J. of Endo. 28(2): 102-104.

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.

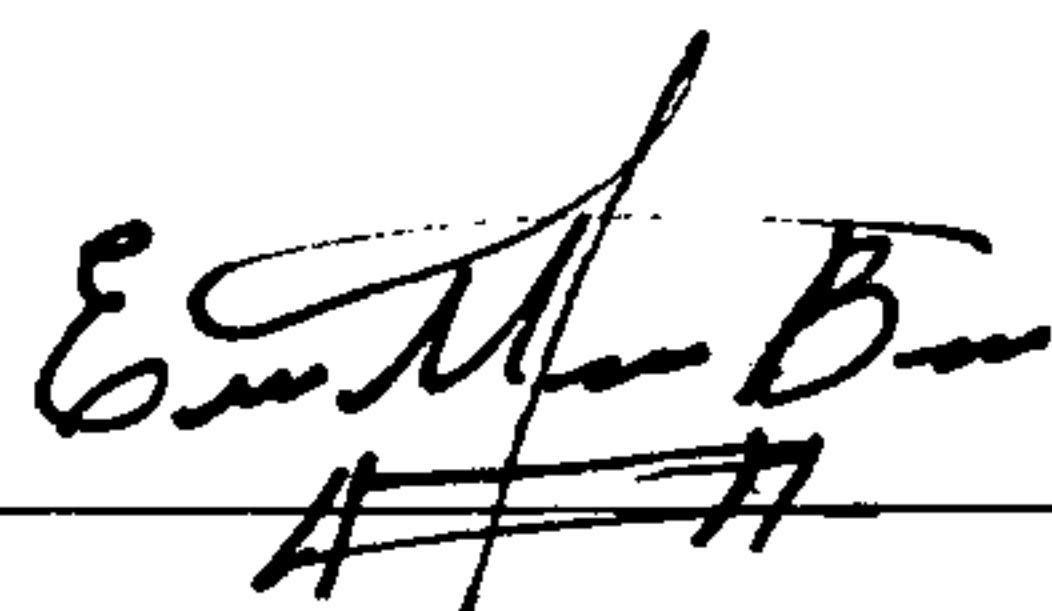
35.Torres. C. P. et al. (2004). **Intracanal placement of calcium hidroxyde: a comparison of techniques, revisited.** J. of Endo. 30(4): 225-227.

36.Undaeta Sánchez, V. et al. (2002). **Evaluación de la efectividad antimicrobiana del uso conjunto de puntas de hidróxido de calcio y clorhexidina al 2% e hidróxido de calcio en la desinfección de conductos radiculares durante el retratamiento endodóntico.** (en línea). Maracaibo: Consultado el 18 de Jul. 2004. Disponible en: http://www.odontologia_online.com/estudiantes/trabajos/vus/vuso1.html.

37. Windholz, M. (1983). **The merck index.**10 ed. U.S.A. Merck & Co Inc. 1650 p.



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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elsi Merari Bernal Nájera', written over a horizontal line.

Elsi Merari Bernal Nájera

Elsi Merari Bernal Nájera
Sustentante

Dr. Werner Florián Jerez
Asesor

Dr. Edwin Milián
Asesor

Dr. Guillermo Carrillo
Asesor

Dra. Ana Magaly López de Rivera
1º. Revisor
Comisión de Tesis



Dr. Manuel Miranda
2º. Revisor
Comisión de Tesis

Imprímase:

Dra. Cándida Luz Franco Lemus
Secretaria Académica

