



**Universidad
Norbert Wiener**

**UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA**

“ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LA PASTA TRIPLE ANTIBIOTICA Y
SU MODIFICACIÓN CON CLINDAMICINA A DIFERENTES
CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* ATCC 29212: ESTUDIO *IN VITRO* COMPARATIVO.

LIMA - 2018”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

Presentado por:

Bachiller: GUTIERREZ ORTIZ, CANDY GENESIS

**LIMA – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y mi familia por el apoyo y amor incondicional que me impulsaron a lograr una meta trazada y culminar satisfactoriamente una parte de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y estima especial a la CD. Ana Cecilia Cupé Araujo por su constante asesoría y al Dr. Blg. Mario Julio Ávila Campos, profesor responsable del Laboratorio de Anaerobios del ICB de la Universidad de São Paulo – Brasil, por su apoyo incondicional para la ejecución del trabajo experimental.

ASESOR DE TESIS

Mg. Esp. C.D CUPÉ ARAUJO, ANA CECILIA

JURADO

Presidenta

Dra Vergara Pinto, Brenda

Secretario

Mg Girano Castaños Jorge

Vocal

Lic. Pareja Cuadros Elizabeth

INDICE

Dedicatoria	3
Asesor de tesis.....	5
Jurado.....	6
Indice de tablas y gráficos	8
Resumen.....	10
1. CAPITULO I. EL PROBLEMA	12
1.1 Formulación del problema.....	14
1.2 Justificación	14
1.4 Objetivo	17
1.4.1 General	17
1.4.2 Específicos.....	17
2. CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Antecedentes	18
2.2. Base teórica	29
2.3. Terminología básica.....	112
2.4. Hipótesis	113
3. CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO	115
3.1. Tipo y nivel de investigación	115
3.3. Población y muestra.....	116
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	117
3.5 Procesamiento y análisis de datos.....	122
3.6 Aspectos éticos	122
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
4.1 Resultados.....	123
4.2. Discusión	1300
5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	1366
5.1. Conclusiones.....	1366
5.2. Recomendaciones	1377
REFERENCIAS.....	139
ANEXOS	151

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO °1 Esquema de la formación del estadio brote o yema dentario

GRÁFICO °2 Esquema del estadio casquete en la fase inicial y avanzada

GRAFICO °3 Esquema del estadio de campana en una fase inicial

GRAFICO °4 Esquema del estadio de folículo dentario aposicional

GRAFICO °5 Factores de virulencia y medios ecológicos del *enterococcus faecalis*

GRAFICO °6 Protocolo de identificación de microorganismos endodónticos

GRAFICO °7 Distribucion Biomodal de valores de MIC de un agente antimicrobiano

GRAFICO °8 Penetración de propilenglicol sobre el área superficial radicular

GRAFICO °9 Esquema de la aplicación de la Pasta Triple Antibiótica

GRAFICO °10 Clasificación de dientes con apice abierto

GRAFICO °11 Procedimiento de la Regeneración endodóntica

GRAFICO °12 Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los grupos TAP y MTAP a diferentes concentraciones expresadas en µg/ml

GRAFICO °13 Comparación de la concentración mínima bactericida de los grupos TAP y MTAP a diferentes concentraciones expresadas en µg/ml

GRAFICO °14 Concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml de TAP sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*

GRAFICO °15 Concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml de MTAP sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*

GRAFICO °16 Identificación de la concentración mínima bactericida de la TAP sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*

GRAFICO °17 Identificación de la concentración mínima bactericida de la MTAP sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*

INDICE DE TABLAS

TABLA °1 Clasificación clínica de las enfermedades pulpares y periapicales

TABLA °2 Microorganismos predominantes en infecciones endodónticas primarias

TABLA °3 Estudios clínicos bajo la terapia de LSTR informados en dientes primarios

TABLA °4 Células madre dentales

TABLA °5 Identificación de la/las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de la TAP y MTAP sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC® 29212

TABLA °6 Identificación de la/las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) de la TAP y MTAP sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC® 29212

TABLA °7 Comparación de la acción antimicrobiana de los grupos de la pasta triple antibiótica (TAP) y la pasta Triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) mediante la MIC y MBC

RESUMEN

Por décadas los dientes necróticos inmaduros se trataron mediante la apexificación, obteniendo resultados poco favorables. Actualmente están siendo reemplazados por la regeneración endodóntica que rige el uso de la pasta triple antibiótica (TAP) en la desinfección de conductos, obteniendo éxito frente a patógenos resistente como el *enterococcus faecalis*. El uso de la minociclina como uno de los componentes de la TAP que produce decoloración dental, ha sugerido reemplazarlo por otros antibióticos; asimismo, contrarrestar los efectos citotóxicos, debido a las altas concentraciones utilizadas de forma empírica. Se determinó la acción antimicrobiana de dos pastas antibióticas sobre cepas de *E. faecalis* utilizadas en la regeneración endodóntica. Se identificó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de las drogas que componen la TAP y la MTAP mediante el método de dilución en caldo sobre cepas de *E. faecalis* en concentraciones de 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml para cada grupo. Existieron cambios significativos de turbidez para la TAP de 2µg/ml y 1µg/ml; siendo esta última la MIC. No se evidenciaron efectos bactericidas en ambas concentraciones. El grupo de la MTAP obtuvo un cambio significativo en relación a su turbidez en todas las concentraciones; con excepción del grupo control, donde la MIC fue 0,125 µg/ml y la CBM 0,5 µg/ml, respectivamente. Se concluye que la MTAP presenta mejor acción antimicrobiana a bajas concentraciones que la TAP utilizada para la desinfección de conductos en la regeneración endodóntica y terapias pulpares de dientes deciduos.

Palabras Clave: Regeneración endodóntica, *enterococcus faecalis*, pasta triple antibiótica, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

For decades, immature necrotic teeth were treated with apexification, obtaining unfavorable results. Currently they are being replaced by the endodontic regeneration that governs the use of triple antibiotic paste (TAP) was proposed for the disinfection of conducts, which was a success in the case of resistant pathogens such as *enterococcus faecalis*. The use of minocycline as one of the components of the TAP that produces discoloration tooth, has suggested replacing it with other antibiotics. Also, counteract the cytotoxic effects, due to the high concentrations used empirically. To determine the antimicrobial action of two antibiotic pastes over *E. faecalis* in endodontic regeneration. The Minimal Inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the drugs that make up the TAP and the MTAP were identified by means of the broth dilution method on strains of *E. faecalis* in concentrations of 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 0.25 µg/ml; 0.125 µg/ml to each group. There were significant changes of turbidity for the TAP of 2µg/ml and 1µg/ml, the latter being the MIC. There was no evidence of bactericidal effects in both concentrations. Furthermore, the MTAP's group obtained a significant change with regards to its turbidity in all concentrations, with the exception of the control group where the MIC was 0,125µg/ml and CBM, 0,5 µg/ml respectively. It concluded that the MTAP presents better antimicrobial action at low concentrations than the TAP used for the disinfection of root canals in endodontic regeneration and pulp therapy of deciduous teeth.

Keywords: Endodontic regeneration, *enterococcus faecalis*, triple antibiotic paste, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Para erradicar la polimicrobiota presente dentro de los conductos radiculares necróticos¹ ó a nivel de tejidos periapicales en dientes deciduos o permanentes inmaduros; la American Academy of Pediatric Dentistry presenta diversos protocolos de terapias pulpaes, tales como la pulpectomía y la apexificación.² Sin embargo, debido a efectos secundarios como la baja microdureza de la dentina radicular, fracturas post apexificación, pigmentaciones por el MTA gris, y periodos largos de tratamiento con hidróxido de calcio utilizando la apexificación en dientes permanentes inmaduro, la Asociación Americana de endodoncia ha propuesto el proceso de

regeneración endodóntica para estos casos.³ Este proceso fomenta la nueva formación del complejo dentino-pulpar no dañado, debido a la ingeniería tisular donde participan las células madre que inducen a concluir el proceso de cierre apical, reforzando la maduración de las paredes dentinarias⁴ en dientes permanentes inmaduros con necrosis pulpar y lesiones periapicales.^{5,6} Por otro lado, han sido reportadas la presencia de bacterias aerobias y anaerobias instauradas dentro del conducto radicular, que son una de las principales causas del fallido tratamiento endodóntico. Esto se debe a ciertos microorganismos que son difíciles de erradicar; tal es el caso del *enterococcus faecalis*, que es una especie comúnmente aislada la cual puede desempeñar un papel en las infecciones endodónticas persistentes, debido a que se adapta a cambios radicales en relación a su medio ambiente y a su vez se instala en lugares difíciles de eliminar como son los túbulos dentinarios formando biofilms.⁷ Como parte del protocolo de regeneración endodóntica, se requiere en la primera fase eliminar la infección polimicrobiana encontrada dentro del conducto radicular y en los tejidos periapicales. En una revisión literaria se ha reportado que el 80% incluye la pasta triple antibiótica (TAP) en la desinfección de conductos debido a su éxito;³⁻⁶ trabajada bajo el concepto de Esterilización de la Lesión y Reparación de los Tejidos LSTR.⁸ Sin embargo, actualmente existe controversia en cuanto a su aplicación, debido a la resistencia bacteriana producto del uso indiscriminado de diferentes medicamentos y su relación con la citotoxicidad sobre la papila dental, células madre y fibroblastos⁹ que han ocasionado los componentes de esta pasta antibiótica utilizada dentro de la clínica de forma empírica. De esta forma se buscan las concentraciones mínimas que eliminen la infección microbiana presente sin perjudicar otros tejidos alrededor del diente; asimismo, se ha demostrado que la

minociclina, la cual es un componente de la TAP, produce decoloración en dientes deciduos y permanentes;¹⁰⁻¹² afectando principalmente la estética de este último. Por tal motivo, diversos estudios han propuesto descartarlo o sustituirlo por antibióticos de amplio espectro como la amoxicilina, cefaclor^{10,14} ó la clindamicina.^{9,12,13} Por todo ello, se desea evaluar la acción antimicrobiana de la pasta triple antibiótica que es el *gold estándar* actualmente, comparada con la pasta modificada con clindamicina sobre cepas ATCC® de *E. faecalis*.¹³ Asimismo, identificar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para tener conocimiento de la concentración exacta con la cual podemos erradicar completamente al *E. faecalis*; quien es una de las bacterias predominantes en las patologías pulpares persistentes y variable principal en cuantificables estudios que buscan una solución a esta problemática.

1.2. Formulación del problema

¿Tendrá la pasta triple antibiótica mejor acción antimicrobiana que la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212?

1.3. Justificación

La utilización de la pasta triple antibiótica (TAP) en terapias pulpares de dientes deciduos y permanentes inmaduros ha obtenido éxito a corto y largo plazo según literatura; debido a la acción antimicrobiana de sus componentes que trabajan bajo el concepto de “esterilizar la lesión y reparar los tejidos” (LSTR), mediante el “tratamiento endodóntico no instrumentado” (NIET). Uno de los grandes problemas que afronta la

TAP es la decoloración dental, siendo el diente permanente inmaduro el más afectado estéticamente; debido a la minociclina, la cual ha sido reportada en distintos casos clínicos como principal causa de esta complicación. Por tal motivo, algunos autores han propuesto no descartar el concepto de LSTR y NIET; sino optar por reemplazar la minociclina por medicamentos de amplio espectro como la amoxicilina, cefaclor o en algunos casos descartarlo y convertirlo en una pasta duantibiótica (DAP). No obstante, estas combinaciones no garantizan el éxito sino se considera otra de las causas principales que es la incubación de ciertos microorganismos difíciles de eliminar; tal es el caso del *E. faecalis*; ya que se posiciona dentro de los túbulos dentinarios formando biofilms, resultando un tratamiento endodóntico desfavorable ocasionado por la resistencia bacteriana que en diferentes ocasiones produce la reagudización del proceso infeccioso, complicando la salud del paciente. Por otro lado, se han identificado efectos citotóxicos sobre las células madre como parte de la definfección del proceso de regeneración endodóntica, debido al uso empírico de estos medicamentos que no presentan una concentración estándar exacta. Teniendo en cuenta que la TAP ha producido cierto tipo de complicaciones dentro del ámbito clínico y citológico, se propone una nueva alternativa que modifica la pasta triple antibiotica con minociclina, quien será reemplazada por la clindamicina con sus siglas (MTAP), la cual ha sido evidencia en una serie de casos clínicos con éxito a largo plazo. Se desea evaluar desde el campo microbiológico la eficacia las drogas que componen la TAP y la MTAP sobre una de las bacterias más prevalentes y difíciles de erradicar en terapias pulpares, como el *E. faecalis*, debido a que hasta el momento no ha sido estudiada desde este ámbito, puesto que es una nueva alternativa principalmente para procesos regenerativos endodónticos; reportada en cuatro artículos según una revisión

bibliográfica en bases de datos como EBSCO y PubMed. Si se obtuviese resultados favorables de esta nueva alternativa para la mejora de la pasta triple antibiótica, se direccionaría bajo el concepto de LSTR con la técnica NIET al igual que la TAP, debido a las ventajas que proporciona a nivel clínico como el tiempo de empleo para su ejecución, sesiones cortas y atraumáticas para el paciente pediátrico; accesibilidad de los materiales, bajo costo y óptimos resultados basados en la evidencia científica, con el aporte de brindar la concentración ideal de cada medicamento que compone la pasta antibiótica modificada; de esta forma dar inicio a estudios más profundos de esta nueva combinación de medicamentos enfocados en la citotoxicidad que pudiese presentar, con la finalidad de constatar si existiese alguna alteración en otros tejidos sanos alrededor del diente; y de esta forma preservar la salud del paciente. No obstante, al rehabilitar los dientes deciduos afectados nos evitamos una serie de problemas como la afectación del diente permanente, pérdida prematura de dientes deciduos, pérdida de espacio para diente permanente. Mientras que la pérdida del diente permanente implica un problema más severo como la afectación del autoestima, mesialización de piezas dentarias, pérdida de dimensión vertical, maloclusión futura, problemas de la ATM, entre otros.

Finalmente la metodología empleada para identificar la acción antimicrobiana de diferentes concentraciones de TAP y MTAP sobre esta cepa anaerobia facultativa será bajo los estándares que propone the Clinical and Laboratory Standards Institute, quienes refieren que la técnica de dilución en caldo es la más apropiada para ser trabajada en este cultivo bacteriano que recibirá diferentes concentraciones diluidas de antibióticos químicamente puros, que dará inicio a estudios más profundos de la nueva alternativa de la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP).

1.4 Objetivo

1.4.1 General

Determinar la acción antimicrobiana de la pasta triple antibiótica y su modificación con clindamicina a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

1.4.2 Específicos

- Identificar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la pasta triple antibiótica (TAP) a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

- Identificar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

- Identificar la concentración mínima bactericida (MBC) de la pasta triple antibiótica (TAP) a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

- Identificar la concentración mínima bactericida (MBC) de la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) a concentraciones de 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

- Comparar la acción antimicrobiana de la TAP y la MTAP sobre la cepa de *enterococcus faecalis*: Estudio *in vitro* comparativo. Lima – 2018.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

López C *et al.* (2017) reportaron en Sevilla - España una serie de casos clínicos tratados con la técnica de revascularización; controlados clínica y radiológicamente por un periodo máximo de 12 meses. Dentro de los dientes diagnosticados con necrosis se trataron incisivos y primeras molares permanentes inmaduros. Todos los casos fueron tratados bajo el protocolo de revascularización; que implicó en la primera fase el acceso a la cámara pulpar, irrigación profunda con hipoclorito de sodio y la medicación intraconducto compuesto por ciprofloxacino, metronidazol, minociclina y

agua estéril; obturados con una pasta temporal. Posterior a 3 semanas retiraron la medicación para limpiar los conductos y fomentar el sangrado apical que sirvió como una estructura de soporte para la revascularización de la pulpa; sobre ello colocaron el MTA y obturaron el diente con una corona compuesta o metálica. Los resultados fueron favorables logrando en corto tiempo el avance del proceso apical en todos los casos. Llegaron a la conclusión que una alternativa a la apexificación sería la revascularización por el corto proceso y buen pronóstico del tratamiento.¹⁴

Devaraj S *et al.* (2016) evaluaron en Chennai - India la eficacia de cinco medicamentos intraconductos frente a biofilms maduros de *enterococcus faecalis*. Dentro del estudio *in vitro* formaron biofilms maduros por 4 semanas que les colocaron diferentes grupos de medicamentos; como la curcumina fotoactivada, 1mg de pasta triantibiótica TAP (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina), 1mg de pasta duantibiótica DAP (metronidazol y ciprofloxacino), gel de clorhexidina al 2%, gel de hidróxido de calcio y un grupo control. Mediante microscopía confocal Láser de barrido (CLSM) analizaron la masa de biopelículas y el porcentaje de bacterias vivas o muertas presentes dentro del conducto radicular, así como en los túbulos dentinarios. La evaluación cuantitativa de unidades formadoras de colonias (CFU/mL) en el biofilm fueron tomadas de la viruta dentinaria, obtenidas de las paredes radiculares a 200 y 400 micras de profundidad. Los resultados reportaron que la curcumina fotoactivada y la TAP ocasionaron una interrupción total en la estructura del biofilm; asimismo constataron que la curcumina fotoactivada presentó un mayor número de células muertas en ambas profundidades mediante la CLSM. Además, observaron una disminución significativa de CFU/mL, utilizando la curcumina fotoactivada, TAP y DAP. En conclusión, demostraron que la

curcumina fotoactivada tuvo mejor actividad antibiofilm y antibacteriana sobre el *E. faecalis*; sin embargo no fue estadísticamente significativo en comparación con la TAP.¹⁵

Alyas S *et al.* (2016) examinaron en EEUU el efecto antimicrobiano directo e indirecto residual de diferentes concentraciones de la pasta triantibiótica (TAP) cargado en un sistema de metilcelulosa sobre un biofilm maduro de *E. faecalis*. Para ello, cultivaron cepas de *E. faecalis* en bloques de dentina esterilizadas (n=60), a quienes aplicaron en seis grupos diferentes (n=10) concentraciones de (1,000 mg / ml), bajas concentraciones de TAP a base de metilcelulosa (100, 10, y 1 mg / ml), pasta de placebo o NaOCl al 1.5%. Posterior a ello, retiraron la TAP y realizaron pruebas de disrupción con el biofilm. Mientras que el proceso indirecto residual utilizó bloques de dentina adicionales (n=120) que fueron preparados bajo el mismo procedimiento que el grupo anterior (n=20), con la diferencia que antes del crecimiento de *E. faecalis*, la TAP se lavó fuera y se sumergió independientemente en solución salina tamponado con fosfato en grupos de 2 o 4 semanas (n=10); asimismo se evaluó al azar una muestra de cada grupo por CLSM; mientras que al resto se les aplicó pruebas de disrupción del biofilm. Los efectos antimicrobianos directos de todos los grupos excepto la pasta placebo erradicaron completamente el biofilm, mientras que 10mg/ml de TAP o concentraciones superiores proporcionan sustancial efecto antimicrobiano residual. Sin embargo, la dentina tratada con 1mg/ml de TAP o NaOCl al 1.5% no mostró un sustancial efecto antimicrobiano residual. Concluyeron que la dentina pretratada con 10 mg/ml o mayores concentraciones mostraron extenso efecto antibacteriano residual, sugiriendo su uso durante la regeneración endodóntica.¹⁶

Kangarlou *et al.* (2016) investigaron en Irán la eficacia antimicrobiana de selladores AH26 y AH plus combinados con amoxicilina (AMX), pasta triantibiótica (TAP) o nanoplata (NS) sobre cepas de *E. faecalis*. El trabajo *in vitro* requirió caldo de tripticasa de soya para el crecimiento del *E. faecalis* que incubaron por 24 h a 37°C ajustados a la escala de McFarland al 0.5. Para obtener la cantidad en polvo de amoxicilina, pasta triantibiótica y nanoplata, optaron por utilizar el 10% del peso total de los selladores. Examinaron la actividad antimicrobiana inmediata, al 1, 3 y 7 día, a partir del crecimiento de *E. faecalis* que fue cultivado sobre agar bilis esculina, embebiendo mezclas de AHPlus, AHPlus + AMX, AHPlus + TAP, AHPlus + NS, AH26, AH26 + AMX, AH26 + TAP y AH26 + NS en discos de papel sobre el cultivo; asimismo un disco de control. Demostraron que la mezcla de los selladores con nanoplata no aumentaron los efectos antimicrobianos; mientras que los selladores con amoxicilina tuvieron alta eficacia inmediatamente de ser aplicado. Sin embargo, la TAP tuvo mayor eficacia antimicrobiana unida a ambos selladores. Concluyeron que la AMX y la TAP mejoraron significativamente las propiedades del AH26 y AH plus; asimismo tales propiedades disminuyeron con el tiempo, siendo mejores que los selladores utilizados solos o mezclados con nanoplata.¹⁷

Sabrah AH *et al.* (2015) evaluaron en Indianopolis – EEUU el efecto antibacteriano de varias diluciones de antibióticos utilizados ampliamente en la regeneración endodóntica contra biofilms de *E. faecalis*; asimismo examinaron la supervivencia de las células madre provenientes de la pulpa dental (DPSCs). Para evaluar los efectos citotóxicos y antibacterianos, elaboraron diluciones de 0,125, 0,25, 0,5, 1 y 10 mg / mL a partir de antibióticos que componen las pastas TAP y DAP. Almacenaron los

antibióticos por 3 días sobre el biofilm de *E. faecalis*, después de este periodo contabilizaron las UFC/mL incubadas sobre placas con agar tripticasa de soya (TSA). Por otro lado, determinaron la citotoxicidad de ambos grupos de antibióticos mediante pruebas de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y pruebas de viabilidad celular (WST-1) que fueron medidos en porcentajes utilizando células madre de la pulpa dental de terceras molares después de 3 días almacenados sobre las diferentes diluciones de antibióticos. Los resultados confirmaron que todas las diluciones de ambos grupos de antibióticos disminuyeron la cantidad de UFC/ml de *E. faecalis*. En relación a la citotoxicidad de los antibióticos, el ensayo de WST-1 demostró que todas las soluciones redujeron la viabilidad de la DPSCs excepto la concentración de 0.125 mg/ml; mientras que las pruebas de LHD reportaron que las concentraciones de DAP (0.5, 0.25, 0.125 mg / ml) y TAP (0,25 y 0,125 mg / ml) no eran tóxicas contra la DPSCs. Concluyeron que todas las diluciones obtuvieron efecto contra el biofilm de *E. faecalis*. Siendo la concentración de 0,125 mg / ml de DAP ó TAP la que menor efecto citotóxico tuvo sobre la DPSCs.¹⁸

Algarni A *et al.* (2015) en Indianapolis - EEUU realizaron un estudio longitudinal para evaluar el efecto inhibitor de geles compuestos por pasta triantibiótica modificada con clindamicina (MTAP) o pasta duantibiótica (DAP) contra la formación de biofilm por *enterococcus faecalis* y *porphyromonas gingivalis*. Cultivaron de forma individual la suspensión de cada cepa; donde posteriormente aplicaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, los geles antibióticos cargados con metilcelulosa de MTAP ó DAP a una concentración de 1 mg/ml en diferentes diluciones de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, y 1:160; asimismo elaboraron una muestra placebo y un control negativo. Después de 48h de

incubación determinaron con tinción cristal violeta al 0.5% la formación del biofilm mediante un espectrofotómetro de microplaca que midió la absorbancia óptica a 490 nm. Realizaron el mismo procedimiento al mes y tercer mes de almacenado el gel a 4°C para verificar su estabilidad antibacteriana. Finalmente encontraron que los geles compuestos por MTAP y DAP redujeron significativamente la formación de biofilm de ambas cepas bacterianas en los tres periodos, independientemente de las diluciones preparadas. Asimismo no se observaron diferencias significativas sobre el efecto inhibidor de ambos geles sobre la biopelícula durante el periodo de prueba; concluyendo que ambos geles de MTAP y DAP a una concentración de 1mg/ml tuvieron efectos significativos sobre *E. faecalis* y *P. gingivalis*.¹⁹

Reyhani M *et al.* (2015) evaluaron en Irán, los efectos antimicrobianos de la pasta triantibiótica (TAP) a diferentes concentraciones sobre un biofilm maduro de *E. faecalis*. Para ello utilizaron 287 incisivos centrales que fueron preparados para ser infectados con cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 dentro del conducto radicular por seis semanas. Los antibióticos fueron diluidos en serie hasta obtener las concentraciones 0.01-, 0,1-, 1-, 10 -, 100-, y 1,000 mg/ml de TAP y solución salina de control que fueron incubadas dentro de los conductos radiculares infectados. Para su evaluación se tomaron muestras de viruta dentinaria durante el intervalo de 1, 2, 3 y 4 semanas; estas muestras fueron cultivadas en placas de agar Mueller Hinton después de una serie de diluciones. Mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) demostraron que la TAP en concentraciones 1.000, 100 y 10 mg / ml, logra erradicar completamente el biofilm; mientras que concentraciones de 1-, 0,1-, y 0,01 mg / ml redujo un número significativo de biofilm comparado con el control dentro del intervalo

de tiempo. Concluyeron que el uso de concentraciones más bajas de la TAP en un corto plazo podría erradicar el biofilm maduro de *E. faecalis* y disminuir los efectos secundarios que podría producir la alta concentración de la TAP.²⁰

Bravo (2015) evaluó en Brasil el efecto antibacteriano de las drogas 3Mix - MP y sus combinaciones alternativas sobre cepas de *E. faecalis* y *F. nucleatum*. Sobre las cepas cultivadas en caldo de tripteína de soya añadieron concentraciones 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56µg/ml; 0,39µg/ml; 0,195µg/ml; 0,097µg/ml de diferentes drogas que componen la 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina. Mediante el método de dilución en caldo identificó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC); mientras que a través del método de difusión en agar modificado determinó la acción antibacteriana de los vehículos de macrogol, propilenglicol y su combinación. Los resultados de la MIC de 3Mix, 3Mix-Cefaclor, 3Mix-Amoxicilina fueron 0,39µg/ml, 0,39µg/ml y 0,195µg/ml sobre *E. faecalis*, mientras que sobre la cepa de *F. nucleatum* fueron 0,195µg/ml, 0,195µg/ml y ≤0,097µg/ml respectivamente. Por otro lado la MBC de 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina fueron >25µg/ml, 25µg/ml y 6,25µg/ml sobre *E. faecalis*, mientras que sobre *F. nucleatum* fueron 0,195µg/ml, 0,195µg/ml y ≤0,097µg/ml respectivamente. Por otro lado no existió efecto de los vehículos ni de su combinación sobre las cepas de *E. faecalis* y *F. nucleatum*. Por tanto concluyó que la droga 3Mix-Amoxicilina tuvo un efecto antibacteriano superior a las combinaciones 3Mix y 3Mix-Cefaclor.²¹

Burrus *et al.* (2014) reportaron en Wisconsin - EEUU tres casos clínicos con el fin de demostrar la eficacia antimicrobiana de una nueva combinación de pasta antibiótica

aplicada en dientes deciduos que requirieron terapia pulpar. Los autores elaboraron la nueva combinación de la pasta medicamentosa bajo el concepto de LSTR, donde proponen el uso de clindamicina por la minociclina, debido a la decoloración que produce; asimismo incorporaron yodoformo por su acción bacteriostática y radiopacidad. La denominaron 3Mix-MP-R, compuesta por metronidazol, ciprofloxacino, clindamicina, propilenglicol, macrogol y yodoformo. Los tres pacientes tenían 4, 6 y 7 años, los dos primeros fueron diagnosticados con necrosis pulpar y absceso dentoalveolar agudo y el último con pulpitis irreversible y absceso dentoalveolar agudo. A todos ellos se les aplicó la pasta 3Mix-MP-R. En los tres casos clínicos encontraron silencio clínico evaluado durante los controles; asimismo evidenciaron radiográficamente un aumento del trabeculado óseo y radiodensidad a nivel de furca. Dado los resultados positivos, los autores concluyeron que la terapia LSTR con esta nueva alternativa garantiza una opción fiable, atraumática y prometedora en terapias pulpares de pacientes pediátricos.¹³

Akçay M *et al.* (2014) evaluaron en Turquía la decoloración en la corona dental producida por diferentes pastas antibióticas que presentaron como base metronidazol y ciprofloxacino con diferentes alternativas como la minociclina, doxiciclina, amoxicilina o cefaclor. Para ello utilizaron 70 dientes extraídos de bovino que fueron cortados hasta la unión cemento-esmalte presentando una longitud radicular de 10mm. Dentro de la preparación intraconducto eliminaron todo el tejido pulpar seguida de la irrigación con hipoclorito de sodio; a partir de ello cada grupo (n = 10 por cada grupo) que fue dividido aleatoriamente recibió los diferentes rellenos: sin llenado (control Grupo), hidróxido de calcio, pasta duantibiótica (DAP), pasta triple antibiótica (TAP) con

minociclina, TAP con doxiciclina, TAP con amoxicilina y TAP con cefaclor que fueron finalmente cubiertas por algodón y un material temporal. A través del espectrofotómetro analizaron los cambios de color “DE” que fueron tomados desde el día 1 hasta las 3 semanas de la colocación de los materiales de relleno. Observaron cambios de coloración de los rellenos compuestos por la TAP con minociclina, TAP con doxiciclina y TAP con cefaclor; mientras que el grupo control, hidróxido de calcio y los grupos DAP no mostraron cambios de color. Concluyeron que todas las pastas antibióticas, excepto la DAP producen decoloración en dientes extraídos de bovinos.²²

Prather B *et al.* (2014) determinaron en Indianopolis - EEUU la microdureza y estructura química de la dentina radicular después de la aplicación de dos concentraciones diferentes de pasta triantibiótica (TAP) y su modificación con clindamicina (MTAP). Seleccionaron un total de 85 premolares que fueron preparados e instrumentados para recibir la TAP y la MTAP. Estos fueron divididos en cuatro grupos (n=17) y uno de control; el primer grupo presentó 1 g/mL de TAP o MTAP y los otros dos grupos de tratamiento recibieron 1 mg/mL de TAP o MTAP cargados de metilcelulosa para darle una mejor consistencia. Las muestras fueron almacenadas por 4 semanas a 37°C con una humedad relativa del 100%. La evaluación de la microdureza fue evaluada antes y después del procedimiento mediante el test de microdureza de Vickers. Asimismo mediante la espectroscopía de infrarrojos transformada de Fourier (FTIR) analizaron la estructura química. Los resultados demostraron una reducción significativa en la microdureza de todos los grupos en comparación con el grupo control, siendo el grupo de 1 g/mL de TAP el que mayor cambio produjo sobre la microdureza. Además, 1 g/mL de TAP y MTAP causaron

menor efecto sobre la matriz mineral de fosfato/amida I. Concluyeron, que aplicar 1mg/mL de TAP o MTAP podría minimizar la reducción de la microdureza y efectos en la estructura química.²³

McTigue DJ *et al.* (2013) reportaron en Ohio – EEUU una serie de 32 casos de endodoncia regenerativa en 28 niños que oscilaban entre 6 y 17 años, a quienes les aplicaron dos diferentes tipos de pasta medicamentosa como parte del protocolo, durante un periodo de 51 meses. Los casos presentaron signos de necrosis, producto de lesiones traumáticas, cariosas y anomalías anatómicas. Utilizaron sedación con óxido nitroso y analgesia de oxígeno a todos los pacientes. Los diez primeros casos fueron tratados con la pasta triantibiótica que contuvo minociclina, que fue cambiada debido a la decoloración dental; no obstante modificaron la TAP sustituyéndolo por clindamicina de 150mg. Posterior a 3 o 4 semanas de la primera fase retiraron la pasta triantibiótica modificada, donde colocaron 3 a 4mm de MTA (gris o blanco) sobre el coagulo sanguíneo hasta la unión cemento-esmalte mediante un microscopio quirúrgico usado en todos los casos. Los resultados evidenciaron la cicatrización apical de 31 dientes, donde 23 dientes tuvieron éxito en el cierre apical, las paredes radiculares de 22 dientes aumentaron su espesor y la longitud radicular aumentó en 21 dientes. Un total de 14 casos presentó decoloración dental. Siete de ellas ocurrieron con el uso de minociclina y como MTA gris. Finalmente informaron que se necesita una relación entre profesionales odontopediátricos y endodoncistas para resolver casos clínicos complicados.²⁴

Chuensombat S *et al.* (2013) evaluaron en Tailandia la citotoxicidad y eficacia antibacteriana de cada compuesto antibiótico de la 3Mix y su combinación. Dentro de la prueba de citotoxicidad extrajeron células de la pulpa dental (DPCs) y células de la papila apical (APCs) a partir de terceras molares, cultivadas en medio Alpha-MEM. Estas fueron expuestas individualmente en cada antibiótico ó mezclada como 3mix a concentraciones de 0.024, 0.097, 0.39, 1.56, 6.25 y 25.00 mg/mL durante 1, 3, 5 y 7 días. A partir de ello, determinaron la viabilidad celular mediante la prueba de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazolio (MTT). Por otro lado, recolectaron muestras bacterianas de dientes necróticos que fueron sembradas en agar sangre; a quienes les aplicaron dos concentraciones antibióticas de 25 mg/ml y 0,39 mg/ml de cada antibiótico ó como 3Mix, para evaluar la eficacia antibacteriana. La concentración mínima de 0.024 mg/ml demostró mayor viabilidad celular en todos los grupos en los diferentes periodos; reportando en el día 7 que 0,39 mg/ml mostró una viabilidad celular al 90%. En los ensayos antibacterianos observaron que 25 mg/ml de la combinación de 3Mix erradicó completamente las bacterias aisladas; mientras que 0,39 mg/ml no logró la eliminación total de bacterias. Concluyeron que todos los medicamentos excepto el metronidazol indujeron citotoxicidad sobre las células cultivadas, siendo la combinación de 3Mix quien proporcionó mayores niveles de citotoxicidad en comparación con un solo medicamento. Finalmente 0,39 mg/ml de 3Mix mostró menor citotoxicidad y redujo significativamente las bacterias aisladas a partir de dientes necróticos.⁹

2.2. Base Teórica

2.2.1 ODONTOGÉNESIS

El proceso de formación de los órganos dentales ubicados en el hueso maxilar de un embrión es denominado odontogénesis, que originará las denticiones primarias y permanentes en forma secuencial. Dentro de este proceso surgen dos capas germinativas que son: el epitelio ectodérmico que da origen al esmalte y el epitelio ectomesénquima o mesénquima cefálico que dará origen al resto de tejidos como, el complejo dentinopulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Mediante el fenómeno de la interacción impulsado por el mesénquima entre otros factores químicos se dará como resultado la determinación, diferenciación y organización de los tejidos dentales. Como parte de la odontogénesis se dividen dos fases denominadas: la morfogénesis y la histogénesis que son etapas fundamentales para la formación completa del órgano dental.²⁵

2.2.1.1 Morfogénesis dentaria

Desarrollo y formación del patrón coronario

También denominada morfodiferenciación, que consiste en el desarrollo y formación de patrones coronarios y radiculares, como resultado de la división, desplazamiento y organización en diferentes capas de las poblaciones celulares, epiteliales y mesenquimatosas que son parte del proceso. Todos estos cambios inician entre la 6ª semana de vida intrauterina, surgiendo la primera diferenciación de la lámina dental a partir del ectodermo que cubre la boca primitiva o estomodeo. Es la diferenciación de la lámina dental mediante una actividad proliferativa intensa y localizada que a la 8ª semana de vida IU se forman 10 epitelios dentro del ectomesénquima ubicados en

cada maxilar que darán lugar a la dentición primaria. Asimismo, de esta lámina surgirán los 32 gérmenes dentarios de la dentición permanente alrededor del 5º mes de vida IU. El desarrollo de cada órgano dental es secuenciado por una serie de etapas, que de acuerdo con su morfología se denominan:²⁵

a) Estadio brote, macizo o yema

Es el periodo donde inicia la formación de los futuros órganos del esmalte, que son originados a partir de una división mitótica de algunas células de la capa basal del epitelio, que no son más que células madres que persistirán durante este proceso en las siguientes etapas.²⁵

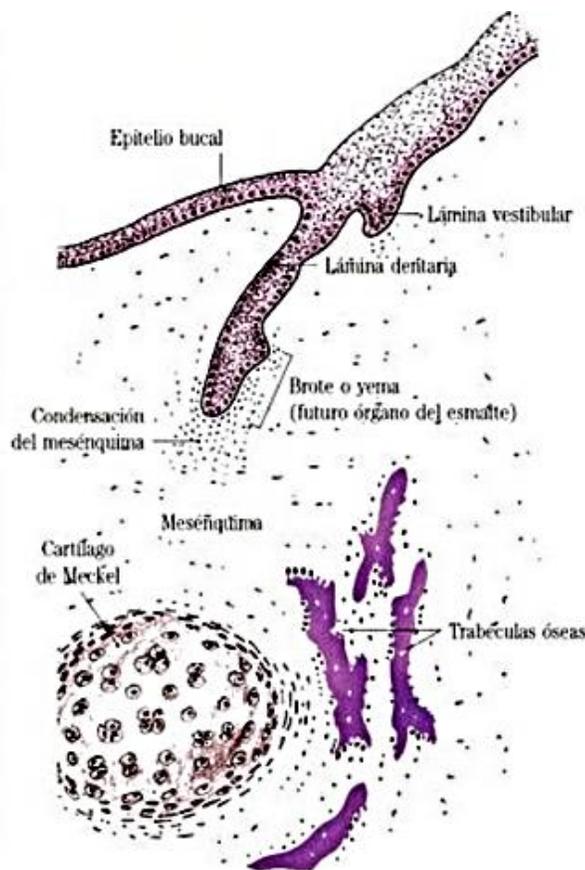


Fig 1. Esquema de la formación del estadio brote o yema dentario. (Adaptada de Gomez de Ferraris et al 2009)

b) Estadio casquete

La proporción desigual del brote alrededor de la 9ª semana determinará una concavidad que posteriormente albergará la lámina dentaria que dará origen al complejo dentinopulpar. El brote que más adelante dará paso al órgano del esmalte, se divide histológicamente en epitelio dental externo e interno y retículo estrellado; donde se han hallado posibles nichos de células madres. Por otro lado, el tejido mesenquimático que se encuentra alrededor del casquete será condensado convirtiéndose fibrilar para dar origen al saco dentario primitivo o folículo dental. En conjunto el órgano del esmalte, la papila y el saco forman el germen dentario que en resumen se obtiene en esta etapa de casquete que es fundamental para el desarrollo dentario.²⁵

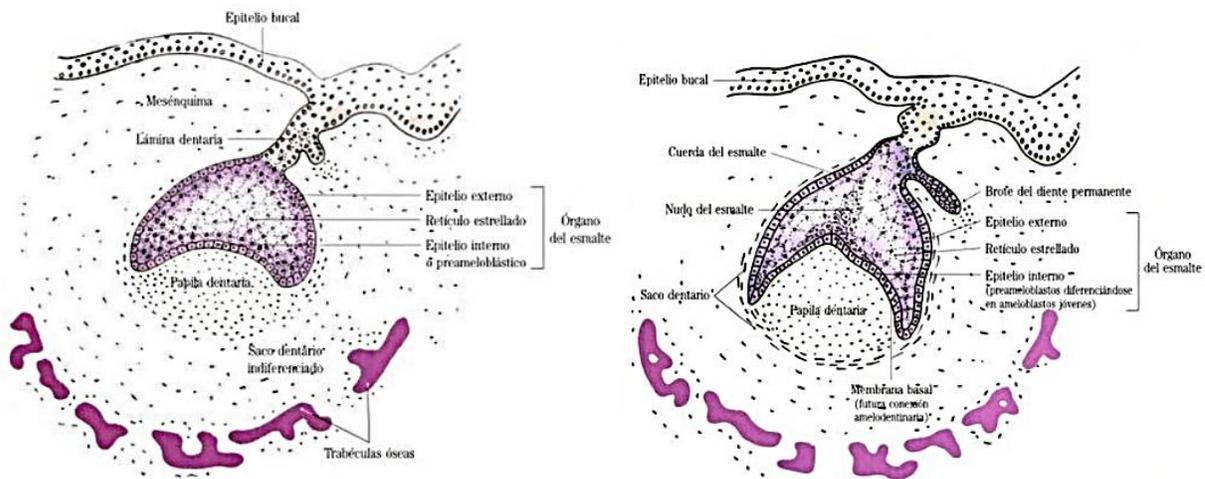


Fig 2. En el esquema izquierdo se observa el estadio casquete en la fase inicial. En el esquema derecho se encuentra el estadio casquete en una fase avanzada. (Adaptada de Gomez de Ferraris et al 2009)

c) Estadio campana

Presenta una etapa inicial y avanzada donde se hacen más evidentes que en el estadio de casquete los procesos de morfo e histodiferenciación del órgano del esmalte, papila

y saco dentario, ocurrido entre las 14 y 18 semanas de vida IU. Uno de los cambios otorgados en este estadio es la presencia del estrato intermedio ubicado entre el retículo estrellado y el epitelio interno ubicados en el órgano del esmalte que cumple un rol importante en la etapa de secreción y mineralización del esmalte; asimismo

Cuadro 1. Cambios estructurales de la fase inicial del estadio campana	
<i>Órgano del esmalte</i> (cuatro capas)	a) epitelio externo b) Reticulo estrellado c) Estrato intermedio: células planas d) Epitelio interno o preameloblastos
<i>Papila dentaria</i>	Sin diferenciación odontoblástica
<i>Saco dentario</i> (dos capas)	Celulovascular Fibrilar

se ha descrito que las células madres ubicadas en el retículo estrellado participarían en la formación del estrato intermedio.²⁵

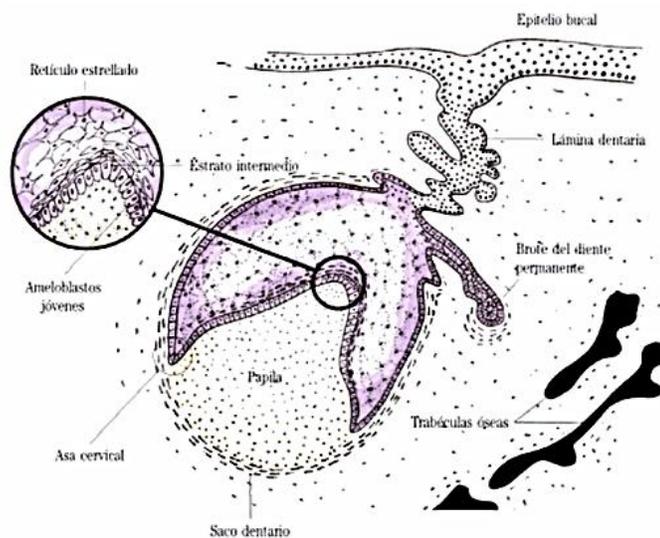


Fig 3. Esquema del estadio de campana en una fase inicial (Adaptada de Gomez de Ferraris et al 2009)

En la etapa de campana avanzada y antes que los odontoblastos comiencen a sintetizar y secretar la matriz dentinaria, los ameloblastos jóvenes experimentan un cambio de polaridad que los transformara por citodiferenciación en ameloblastos secretores o maduros. Esta se caracteriza por presentar en su región proximal el proceso de Tomes que sintetiza y secreta esmalte prismático. Por otro lado, la diferenciación de los odontoblastos realizados en la papila dental a partir de células ectomesenquimatosas presenta similar proceso a los ameloblastos convirtiéndose en odontoblastos jóvenes y, por último en odontoblastos maduros o secretores. Asimismo, en su extremo libre o proximal se encuentra el proceso odontoblástico o prolongación odontoblástica localizada en la matriz dentinaria. Los odontoblastos presentan las características ultraestructurales de una célula secretora de proteínas para exportación; asimismo, cuando se forma dentina, la zona central de la papila se convierte en pulpa dental, caracterizada por la presencia de fibroblastos jóvenes. La presencia de fosfatasa alcalina en los odontoblastos, zona subodontoblástica y estrato intermedio del órgano del esmalte nos indicaría una colaboración de forma directa o indirecta en diversos procesos como la formación o mineralización de la matriz orgánica del esmalte y dentina. Finalmente, el saco dentario en la etapa campana se encuentra presente con mayor notoriedad, debido a su formación de dos capas, una interna celulo-vascular y una externa con gran aportación de fibras colágenas. A partir de la capa celular constituida por células mesenquimatosas indiferenciadas derivaran los componentes del periodoncio de inserción: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. En esta etapa se observa que la lámina dental se ocupa en el lugar más profundo, situándose detrás del órgano del esmalte para formar el esbozo o brote del diente permanente.²⁵

Cuadro 2. Cambios estructurales de la fase avanzada del estadio campana

Órgano del esmalte
(cuatro capas)

- a) epitelio externo: discontinuo por invasión de capilares del saco
- b) Retículo estrellado: más abundantes partes laterales
- c) Estrato intermedio: mayor números de capas zona cúspides o borde incisal
- d) Ameloblastos jóvenes: células cilíndricas con organoides no polarizados

Papila dentaria

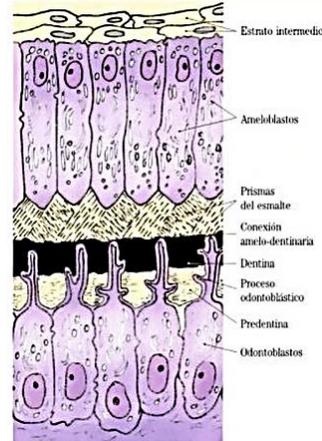
Diferenciación odontoblástica
Periferia papila

Predentina (Sin mineralizar)

Dentina

Saco dentario

Dos capas bien manifestadas



d) Estadio folículo dentario, terminal o maduro

Esta etapa se inicia con el depósito de matriz del esmalte sobre las capas de la dentina en desarrollo mediante periodos de actividad y reposo. La formación de la matriz orgánica, a cargo de los odontoblastos para la dentina y de los ameloblastos para el esmalte, son seguidos por la fase inicial de su mineralización; como por ejemplo en dientes primarios al promediar entre el quinto y sexto mes de vida IU. Una vez formado el patrón coronario e iniciado el proceso de histogénesis mediante mecanismos de dentinogenesis y amelogenesis, empieza el desarrollo y formación del patrón radicular.²⁵

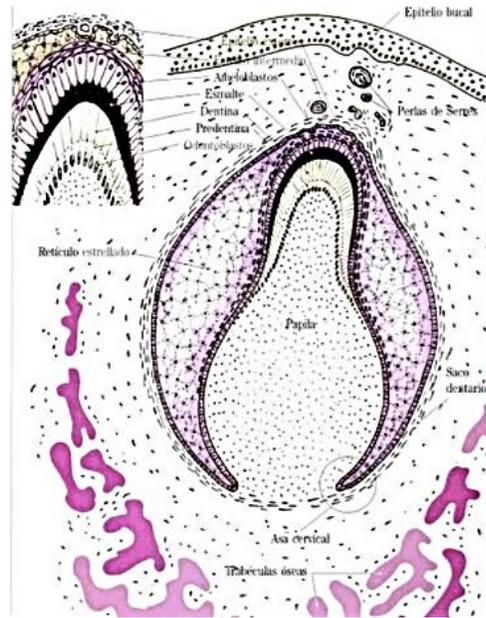


Fig 4. Esquema del estadio de folículo dentario aposicional (Adaptada de Gomez de Ferraris et al 2009)

Desarrollo y formación del patrón radicular

La vaina epitelial de Hertwing presenta un rol importante dentro de la inducción y modelación de la raíz dental. Esta resulta de la fusión del epitelio interno y externo del órgano del esmalte sin la presencia del retículo estrellado a nivel del asa cervical. La vaina prolifera en profundidad en relación con el saco dentinario por su parte externa y con la papila dentaria internamente. Al proliferar, la vaina induce a la papila para que se diferencien los odontoblastos radiculares. Al depositarse la primera capa de dentina radicular, la vaina epitelial de Hertwing pierde continuidad formando los restos epiteliales de Malassez que en un adulto persisten en el ligamento periodontal. Estos restos son fuente de origen del revestimiento epitelial de quistes radiculares. En resumen, la producción de dentina por los odontoblastos es seguida por la regresión de la vaina y la diferenciación de cementoblastos provenientes de células del saco dentinario que rodea la vaina.^{25,26}

2.2.2 LA PULPA

Es un tejido conjuntivo laxo de origen mesenquimatoso hallada en medio de la cámara pulpar y los conductos radiculares, que forman junto con la dentina el complejo dentinopulpar. La función primaria del tejido pulpar es la formación de dentina inducida por los odontoblastos. Entre sus funciones secundarias se encuentran la función sensitiva, función de nutrición, y función de protección. La pulpa dental presenta un alto contenido de células de fibroblastos, macrófagos y linfocitos, fibras reticulares, fibras colágenas, líquido tisular, sustancia fundamental amorfa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, y nervios.²⁶

Los daños pulpares con frecuencia pueden causar molestias y alteraciones. Por ejemplo, algunas lesiones que no derivan de la pulpa pueden diferenciarse con unas de origen periodontal, que finalmente podría provocar un erróneo diagnóstico y plan de tratamiento.²⁶

2.2.3 PATOLOGÍAS PULPARES

Esta enfermedad que afecta a los dientes y sus tejidos circundantes ha sido motivo de consulta-urgencia odontológica a consecuencia de la odontalgia dolorosa que la caracteriza y las complicaciones que podrían conllevar a comprometer la salud general del paciente, en caso no sea tratado en el tiempo establecido por el profesional.²⁷ Todo surge a partir de un irritante biológico, físico, químico o eléctrico que altera la pulpa dental produciendo cambios anatomopatológicos que en conjunto con las evidencias semiológicas podría resolver favorablemente la lesión leve o disfunción ocasionada por la agresión. Si en caso fuese grave la situación, inclinándose por una resistencia larga y pasiva conllevaría a la cronicidad de la patología pulpar pudiendo degenerar

los tejidos alrededor del diente propiciando la necrosis pulpar o patologías perirradiculares.²⁸

Etiopatogenia

Son diversos los estímulos que producen la inflamación y necrosis pulpar, así como las complicaciones periapicales. Sin embargo existen tres que han sido reportados en innumerables investigaciones, entre ellas la caries dental, las bacterias, el trauma y las anomalías o aberraciones del desarrollo.^{24,26,29-32}

a) Caries

Se considera a la caries dental como el principal factor causal de las alteraciones pulpares.²⁸ Afectando a un 46,9% y 58,5% de los pacientes que acuden a consulta, debido a patologías pulpares o periapicales. A consecuencia de la caries dental se realizan tratamientos restauradores que en ocasiones no fueron tratados correctamente; conllevándolos a tratamientos endodónticos por alguna afección pulpar. No obstante, los tratamientos defectuosos como resultado de la caries dental son la segunda amenaza que afecta la salud pulpar, encontrándose entre el 21,6% y 28,3% que compromete a la población.^{30,31}

b) Bacteria

Dentro del ambiente clínico existen diferentes factores potencialmente destructivos, especialmente de índole bacteriano que pueden poner en peligro la vitalidad pulpar. Como por ejemplo las bacterias que se encuentran en el medio oral y se filtran en los márgenes de las restauraciones. Este factor actúa dentro del proceso carioso durante el crecimiento y muerte celular de los microorganismos liberando elementos que podrían iniciar las respuestas pulpares mediante diversos mecanismos, como:²⁹

- La instalación de compuestos bacterianos que actúan como antígenos iniciadores de la respuesta inmunológica.
- La liberación de mediadores inflamatorios promovidos por las células de la pulpa, que incluyen a los odontoblastos, quienes son las primeras células de defensa bacteriana.

c) Trauma

Los procedimientos dentales que pueden provocar calor friccional cerca a la pulpa han demostrado la presencia de necrosis pulpar con una frecuencia del 10 al 15% posterior a 5 y 10 años del tratamiento.²⁹ Asimismo, diferentes situaciones de traumatismos accidentales también podrían ocasionar una alteración dentro del complejo dentino-pulpar que provoque la muerte de la pulpa; dirigiéndose en un futuro a ser el factor etiológico principal que reemplace a la caries dental, debido a que su incidencia ha ido aumentando en estos últimos años, principalmente en escolares que oscilan los 6-10 años.²⁸ Sin embargo las cifras actuales demuestran que el 11,3% de los casos presentados en consulta acuden por esta razón.³⁰

d) Anomalías del desarrollo

A menudo los odontólogos se encuentran frente a pacientes de edad temprana que presentan anomalías anatómicas en ambas denticiones. En la mayoría de casos la pulpa se degenera conllevándolos a un estado de necrosis y el paciente llega a consulta con el problema complicado por la cronicidad de la situación, manifestando dolor, inflamación y en ocasiones la presencia de fistula que nos indica un proceso agudo.³² Se han reportado del grupo de anomalías dentarias de forma las que mayormente están involucradas a desatar alguna alteración pulpar, tal es el caso de los tubérculos hallados en la zona central de los dientes.²⁴

Clasificación

Miller, hace más de un siglo describió que las bacterias están relacionadas de cierta manera con las enfermedades de la pulpa y planteó la hipótesis que estas bacterias son el principal detonante de enfermedades de origen endodóntico. Esta hipótesis ha sido demostrada con el paso de los años, como las bacterias se han visto implicadas en la patogénesis y progresión de la enfermedad pulpar y periapical.³³ Desde ese periodo hasta la actualidad han surgido diversos intentos para concretar la clasificación de las patologías pulpares y periapicales, siendo la clasificación de la American Board of Endodontics (ABE) en 2007 entre la más descrita y aceptada dentro de la literatura para el diagnóstico de estas enfermedades.³⁴

Tabla 1. Clasificación clínica de las enfermedades pulpares y periapicales según la ABE.

ENFERMEDAD PULPAR	ENFERMEDAD PERIAPICAL (APICAL)
Pulpitis reversible	Periodontitis apical sintomática
Pulpitis irreversible sintomática	Periodontitis apical asintomática
Pulpitis irreversible asintomática	Absceso apical agudo
Necrosis pulpar	Absceso apical crónico
Tratamiento previamente iniciado	

a) Pulpitis reversible

La pulpa dental en este estado se encuentra irritada provocando molestia al paciente; a consecuencia de factores etiológicos como la caries dental, dentina expuesta, tratamientos recientes o restauraciones defectuosas. En estas circunstancias resolver el problema de forma conservadora sería lo más viable. Sin embargo, las molestias

pueden seguir surgiendo en caso la dentina se esponga nuevamente ocasionando una sensibilidad dentinaria por los movimientos ejercidos a los líquidos tubulares.³⁴

b) Pulpitis irreversible

Esta situación se origina cuando el tejido pulpar se encuentra enfermo y se debe extirparlo.³⁴

Pulpitis irreversible asintomática

En ocasiones una caries profunda no producirá indicios de la afectación del nervio ni clínica ni radiográficamente; por ello se debe instaurar un tratamiento endodóntico para evitar una pulpitis irreversible sintomática y no llegar a una necrosis pulpar.³⁴

Pulpitis irreversible sintomática

La principal característica es el dolor intermitente o espontáneo que suscita el paciente; siendo los cambios de temperatura drásticos los que provoquen con mayor facilidad estos episodios, incluso después de eliminar el estímulo térmico. El dolor puede ser agudo o sordo, localizado o referido producto de antecedentes dentales. Radiográficamente no se observan cambios marcados en un inicio; más adelante si se podría observar un ensanchamiento periodontal y podría darse una irritación pulpar, debido a una calcificación extensa de la cámara pulpar y ligamento periodontal. Al no solucionar esta complicación, las circunstancias podrían conllevarlo a la necrosis pulpar.³⁴

Entre las enfermedades pulpares clasificadas según la ABE, se encuentran con mayor incidencia estudios orientados a resolver ciertas patologías como la necrosis pulpar y lesiones periapicales, debido a la gran incidencia microbiana instauradas en dientes deciduos y permanentes donde han evidenciado que existe similar presencia de microorganismos anaerobios encontramos en ambas denticiones.

c) Necrosis pulpar

Es la muerte pulpar del diente donde dejan de funcionar todos los procesos metabólicos de este órgano, conllevándolo a una pérdida de su estructura como resultado final de un proceso patológico en el cual la pulpa no puede reintegrarse a la normalidad por no tener capacidad de reacción.³⁵ Es la muerte de la pulpa como resultado de una pulpitis irreversible no tratada o de una lesión traumática que interrumpa la irrigación sanguínea de la pulpa. Esta patología pulpar puede ocasionar una necrosis pulpar puede ser parcial o total.³⁶ Pudiendo no responder a pruebas eléctricas ni estímulos por el frío; pero a veces podría desatar algún dolor cuando aparecen síntomas por extensión de la enfermedad de los tejidos periradiculares e incluso mostrar síntomas de pulpitis irreversible. Las bacterias pueden seguir creciendo en el interior del conducto una vez la pulpa este necrosada.³⁴ Instaurándose bacterias anaerobias como las encontradas por Sato en el año de 1993, quien halló en dientes primarios 276 cepas bacterianas; 251 (91%) eran anaerobios estrictos. De ellos se encontraron cepas como el Peptostreptococcus (25%), Propionibacterium (19%), Eubacterium (17%) y Fusobacterium (1 al 3%) quienes eran parte principal de la flora bacteriana en las lesiones de los dientes deciduos en humanos. Bifidobacterium (2%), Lactobacillus (1%), Actinomyces (1%) y Veillonellas (0,7%) se encontraron en menor cantidad dentro de la flora.^{36,37}

d) Previamente tratado

Es cuando el diente presenta un tratamiento endodóntico no quirúrgico previo y cuyo sistema de conductos ha sido obturado con algún cemento radicular. Pudiendo presentar o no sintomatología y requiriendo un tratamiento quirúrgico adicional.³⁴

e) Tratamiento iniciado previamente

Se da cuando el tratamiento endodóntico ha sido abordado parcialmente. Realizándose una pulpotomía o pulpectomía anteriormente.³⁴

Enfermedad periapical

Son procesos inflamatorios y/o infecciosos de poca intensidad y de larga duración localizados a nivel de los tejidos periapicales del diente.^{38,39}

f) Periodontitis apical sintomática

Su principal malestar se efectuará cuando el paciente ocluya o a la percusión del diente otorgando una respuesta dolorosa. Su respuesta a estímulos es variable, mientras que radiográficamente se muestra un ligamento periodontal ensanchado pudiendo o no hallar una radiolucidez a nivel apical.³⁴

g) Periodontitis apical asintomática

Se refiere normalmente sin síntomas clínicos, ni tampoco responde a pruebas de vitalidad pulpar. Muestra una radiolucidez perirradicular. El diente en cuestión puede no mostrar síntomas a la oclusión pero si puede mostrarlo a la percusión.³⁴

h) Absceso apical agudo

El dolor que presenta es muy doloroso a la presión al morder, percusión y palpación. No responde a pruebas de vitalidad pulpar; pero sí existe una movilidad variable. A nivel radiográfico puede observarse ensanchamiento del ligamento periodontal y hasta una radiolucidez a nivel perirradicular. Clínicamente el pliegue mucobucal y tejidos faciales mostrarán tumefacción. Con frecuencia podría presentarse fiebre y ganglios linfáticos próximos sensibles a la palpación.³⁴

i) **Absceso apical crónico**

Frecuentemente no presenta síntomas clínicos ni tampoco responde a pruebas de vitalidad, pero sí una radiolucidez a nivel perirradicular. Su principal diferencia es la supuración intermitente mediante el tracto sinusal.³⁴

Bacterias predominantes en lesiones periapicales

Entre las bacterias predominantes en lesiones periapicales encontramos al *Fusobacterium Nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococos micros*, *Peptostreptococos anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* y *Wolinella recta*. Por otro lado existe fuertes asociaciones positivas entre las bacterias *F. nucleatum* y *P. micros*, *Porphyromonas endodontalis*; *Selenomonas Sputigena* y *W. recta*. Asociación positiva entre las bacterias *P. intermedia* y *P. micros*, *P. anaerobius* y la *Eubacteria*. Mientras que bacterias como *estreptococo*, *Propionibacterium propionica*, *Capnocytophaga ochracea* y *Veillonella prvula* no presentan asociación con otras bacterias dentro de los conductos radiculares de dientes con periodontitis apical.⁴⁰ Estudios realizados en dientes primarios con lesiones pulpares y periapicales reportan que existen similar presencia de microorganismos anaerobios encontramos en dientes permanentes.⁴¹

2.2.4 MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

Desde 1928 se han realizado prácticas de tratamientos de conducto que han logrado tener éxito a lo largo de todo este tiempo, debido a las constantes investigaciones dentro de esta especialidad. Una de las razones principales se encuentra la comprensión total de la microbiología interviniente de la patología endodóntica, que coopera con evaluar la posibilidad de buscar nuevos métodos y tratamientos que eliminen microorganismos resistentes hallados dentro del conducto radicular, los cuales vienen siendo un desafío para el profesional.⁴² Esto se debe a la infección instaurada dentro del sistema de conductos radiculares como consecuencia de una necrosis pulpar o un tratamiento de conductos anteriormente realizado producto de microorganismos que podrían conllevar a la progresión y perpetuación de diferentes formas de periodontitis apical.⁴³

2.2.4.1 Vías de infección

En condiciones normales el complejo dentino-pulpar se encuentra protegido por el cemento y el esmalte para evitar la interacción con los microorganismos hallados dentro de la cavidad bucal; sin embargo diferentes situaciones ocasionan que estos elementos del diente sean alterados; a consecuencia de ello se expone al complejo dentino-pulpar a un riesgo de infección microbiana.⁴² Entre las principales vías de infección están los túbulos dentinarios, exposición pulpar directa, enfermedad periodontal y anacoressis.⁴³

a) Túbulos dentinarios

En un diente vital, posterior a una lesión cariosa o dentro de un tratamiento restaurativo los microorganismos orales pueden involucrarse en dirección centrípeta sobre la pulpa dental a una distancia de 2mm.⁴² Se conoce que el diámetro de túbulos dentinarios más pequeños son compatibles con el diámetro celular de las principales bacterias orales que oscilan entre 0.2 a 0.7 μm . Por otro lado, en dientes no vitales se propaga rápidamente la invasión bacteriana dentro de los tubulos dentinarios a diferencia de un diente vital por la presencia de los movimientos exteriores del fluido dentinal y los contenidos tubulares que influyen sobre la permeabilidad dentinaria, así como la presencia de esclerosis dentinal, dentina reparativa, smear layer o acumulación intratubular de moléculas propias de defensa.⁴³

b) Exposición pulpar directa

La exposición directa de la pulpa dental es la que fácilmente podría ocasionar un infección endodontica cuando entre en contacto con la parte séptica de la pulpa dental y los microorganismos de la cavidad oral derivados de la saliva, la placa dental y la superficie expuesta que podría haber sido originada por caries dental, traumas con fractura coronaria o de naturaleza iatrogénica dentro de los procedimientos.^{42,43}

c) Enfermedad periodontal

Los microorganismos asociados al biofilm subgingival como parte de la enfermedad periodontal podrían llegar a la pulpa dental; como también podría darse que estos microorganismos alcancen el periodonto a través de los canales laterales o el foramen apical, durante una profilaxis dental debido a la luxación dental; sin embargo más significativo son la bolsas periodontales que provocan la migración de la inserción

epitelial proporcionando una vía peligrosa de bacterias de la cavidad oral hacia la pulpa dental.^{42,43}

d) Anacoresis

Es un proceso donde los microorganismos son transportados por medio sanguíneo o linfático hacia el área de daño tisular que puede ser ocasionado por un traumatismo o procedimiento quirúrgico que produjera inflamación sin necesidad de ocasionar la exposición pulpar. Hasta el momento no existen evidencias claras que este proceso pudiese producir una infección del conducto radicular, a no ser que se realice un sobreinstrumentación durante el proceso de la bacteremia transitoria resultando una injuria periodontal.^{42,43}

e) Restauración defectuosa

Diversos estudios han demostrado que las bacterias orales del medio salivar pueden involucrarse en un tiempo de 6 semanas dentro del periápice así se encuentre el conducto radicular obturado en caso el material temporal se fracture o se rompa, asimismo si la restauración final es inadecuada también podría producir una infección del periápice.⁴²

f) Extensión

Esta situación se debe a la presencia de un diente adyacente infectado, donde los microorganismos de esta pieza dental se conducen a través de conductos principales o laterales de un diente sano propagando su infección debido a la continuidad de tejidos.⁴²

2.2.4.2 Patógenos Endodónticos

Existen alrededor de 700 especies bacterianas que se podrían encontrar en la cavidad oral, siendo 100 a 200 especies las más prevalentes en el ser humano sano.⁴⁴ Identificados varios años atrás por métodos de cultura que ayudaron a clasificar diferentes microorganismos patógenos endodónticos, quienes actualmente son parte de infecciones que afectan el complejo dentino-pulpar. Si bien los diferentes métodos de cultura dieron información veraz de ciertos microorganismos patógenos, actualmente gracias las técnicas de biología molecular se puede conocer la asociación de la microbiota con diferentes tipos de infección endodóntica; es decir un estudio con mayor precisión. Estas infecciones endodónticas presentan una naturaleza polimicrobiana, representada mayormente por bacterias anaerobias estrictas en infecciones primarias. Clasificadas de acuerdo a su localización anatómica (intrarradicular o extrarradicular) subdivido en: primaria, secundaria o infección persistente.⁴³

2.2.4.2.1 Infección intraradicular

Es producto de la colonización de microorganismos dentro del conducto radicular que están clasificados como primaria, secundaria o infección persistente:⁴³

Infección intraradicular primaria

Los primeros microorganismos en invadir y colonizar los tejidos de la pulpa necrótica son los que ocasionan la infección intraradicular primaria. Esta infección se caracteriza porque está compuesto de 10 a 30 especies de bacterias y 10^3 y 10^8 células bacterianas por conducto. Entre ellas dominada por bacterias anaerobias, así como

algunas especies facultativas o microaerófilas.^{43,45} Los patógenos que ocasionan estas infecciones intraradiculares son las siguientes:

- a) Los *Bacteroides melaninogenicus* pertenecientes a bacterias anaeróbicas Gram negativas que originan pigmentaciones negras han sido nuevamente clasificadas en: especies sacarolíticas – *Prevotella* y especies asacarolíticas - *Porphyromonas*.⁴⁶
- b) La especie *Tannerella forsythia*, anteriormente denominada *Bacteroides forsythus* ó *Tannerella forsythenis* que fue el primer microorganismo periodontal hallado en infecciones endodónticas.⁴⁷
- c) Las especies *Dialister* son asacarolíticas, obligatoriamente anaeróbicas y Gram negativos, que han sido detectados de forma consistente en infecciones endodónticas.⁴²
- d) El *Fusobacterium* ha sido comúnmente encontrado como parte de la microbiota endodóntica.⁴²
- e) Las espiroquetas son un filo de bacterias Gram negativas móviles, en forma de espiral con flagelos periplásmicos. Todos las que habitan en el medio oral pertenecen al género *Treponema*.⁴⁸
- f) Dentro de la microbiota endodóntica también han sido halladas barras anaeróbicas de Gram positivas.⁴²
- g) También se ha encontrado la presencia de cocos Gram positivos como el *enterococcus faecalis*, quien es variable principal de diversos estudios con la finalidad de erradicarlo dentro del tratamiento de conductos.^{15-21,42}
- h) Otras especies bacterianas en baja o moderada concentración también han sido evidenciadas mediante pruebas de cultivo.

- i) A diferencia de las especies anteriores, otro estudio utilizó un análisis molecular de la microbiota asociada a infecciones endodónticas sintomáticas y asintomáticas donde indicaron que la diversidad bacteriana endodóntica es mayor que la descrita anteriormente por medios de cultivo; asimismo observaron que la estructura de la microbiota difiere significativamente entre las infecciones sintomáticas y asintomáticas.⁴⁹
- j) Entre otros microorganismos hallados se encuentran los hongos, específicamente la especie de *Candida albicans*. Asimismo, se ha reportado la presencia de archaea metanogénicas en la enfermedad periodontal y la periodontitis apical crónica, algo poco frecuente, debido a que estos microorganismos son extremófilos y recientemente se han hallado en el cuerpo humano en zonas no extremas.⁵⁰ Desde hace varios años se conoce que los virus no podrían sobrevivir en un ambiente necrótico, puesto que requieren células viables del huésped para infectar y posteriormente replicar el genoma viral.⁵¹

Tabla 2. Microorganismos predominantes en infecciones endodónticas primarias que incluyen bacterias, hongos y virus.			
PATÓGENOS RELACIONADOS A LA INFECCIÓN INTRARADICULAR PRIMARIA			
Especies		Especies	
Prevotella	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella tannerae</i> <i>Prevotella multissacharivorax</i> <i>Prevotella baroniae</i> <i>Prevotella denticola</i>	Anaerobios Gram positivos	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Actinomyces spp.</i> <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Olsenella spp.</i> <i>Slackia exigua</i> <i>Mogibacterium timidum and Eubacterium spp.</i>
Porphyromonas	<i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Cocos Gram positivos	<i>Parvimonas micra</i> <i>Streptococcus spp.:</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus mitisi</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>enterococcus faecalis.</i>
Cytophaga-Bacteroidetes	<i>Tannerella forsythia</i>	Otras especies bacterianas en bajas o moderadas concentraciones	<i>Campylobacter rectus</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Catonella morbic</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Neisseria mucosa</i> <i>Centipeda periodontii</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Corynebacterium matruchotii</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Lactobacilos anaerobios.</i>
Dialister	<i>Dialister pneumosintes</i> <i>Dialister invisus</i>	Filotipos hallados mediante análisis molecular en periodontitis apical	<i>Dialister oral clone BSO16</i> <i>Migasphaera oral clone BSO16</i> <i>Solobacterium</i> <i>Olsenella</i> <i>Eubacterium</i> <i>Cytophaga</i> <i>Lachnospiraceae oral clone 55A-34</i> <i>Veillonella oral clone BP 1-85</i> <i>Bacteroidetes oral clone XO 83</i> <i>Prevotella oral clone PUS 9.180</i> <i>Eubacterium oral clone BP 1-89</i> <i>Lachnospiraceae oral clone MCE 7-60.</i>
Fusobacterium	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium periodonticum</i>	Hongos	<i>Cándida albicans</i>
Treponema	<i>Treponema denticola</i> <i>Treponema sacranskii</i> <i>Treponema parvum</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Treponema lecithinolyticum</i>	Archaea	Archaea metanogénica
		Virus	Citomegalovirus humano Virus Epstein-Barr

La presencia de virus ha sido reportada sólo en pulpas vitales no inflamadas en pacientes infectados con VIH y herpes virus, donde las células vivas se encuentran en abundancia. Las especies de citomegalovirus humano y el virus Epstein-Barr puede

estar implicados en la patogénesis de la periodontitis apical, por lo que aún se requieren mayores estudios.⁵²

2.2.4.2.2 Infección extraradicular

A menudo los microorganismos se limitan dentro del conducto radicular protegido por la barrera de defensa. Sin embargo, cuando estos sobrepasan la zona apical invaden e inflaman tejidos periapicales se genera una infección extraradicular a consecuencia en algunas situaciones de una infección intraradicular. La expresión característica de esta infección es la manifestación clínica de un absceso apical agudo con secreción purulenta a nivel del tejido periapical. La problemática de que una infección extraradicular dependa de una infección intraradicular es de importancia dentro de la terapéutica, debido a que la primera podría solucionarse a través de un tratamiento de conductos, mientras que la infección independiente requeriría de una intervención quirúrgica para ser resuelto.^{42,43} Entre los microorganismos predominantes en esta patología se encuentran:^{53,54}

- *Actinomyces spp.*
- *Propionibacterium propionicum*
- *Treponema spp.*
- *Porphyromonas endodontalis*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Treponema forsythia*
- *Prevotella spp.*
- *Fusobacterium nucleatum.*

2.2.4.2.3 Bacterias persistentes a tratamientos de conductos

La resistencia de ciertos microorganismos a la desinfección y la preparación biomecánica utilizando diferentes antimicrobianos; asimismo su falta de nutrientes dentro de un conducto radicular sellado podrían ocasionar infecciones intraradiculares persistentes. A diferencia de las infecciones primarias que implica una mayor cantidad de microorganismos, este grupo suele contar con un menor número de especies, tales como bacterias grampositivas facultativas o anaerobias.⁴³ Entre las bacterias gramnegativas prevalentes se encuentran:⁴²

- *Fusobacterium nucleatum*
- *Prevotella* spp.
- *Campylobacter rectus*

Por otro lado, entre las bacterias grampositivas predominantes están:⁴²

- *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis*)
- *Lactobacilli* (*Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus acidophilus*)
- *Staphylococci*
- *E. faecalis*
- *Olsenella uli*
- *Parvimonas micra*
- *Pseudoramibacter alactolyticus*
- *Propionibacterium* spp.
- *Actinomyces* spp.
- *Bifidobacterium* spp.

- Eubacterium spp.

De igual forma también han sido reportado hongos, principalmente *Candida albicans* en menores concentraciones. Al igual que el *enterococcus faecalis* quienes repetidamente han sido identificados como las especies más comunes recuperadas de los conductos radiculares que fueron tratados endodónticamente de forma errónea produciendo infecciones persistentes.⁵⁵

2.2.4.3 *enterococcus faecalis*

Es un coco grampositivo y anaerobio facultativo que se encuentra como parte de la flora bacteriana a nivel intestinal, pero también pueden habitar la cavidad oral y el surco gingival.⁴² Este microorganismo ha sido identificado repetidamente en casos clínicos que han sido tratados nuevamente, debido a tratamientos endodónticos fallidos y conductos radiculares con infecciones persistentes^{7,17,20,42,56} que en estudios iniciales fueron signos de periodontitis apical crónica, identificados entre un 23 a 70% de cultivos aislados y de lesiones periapicales refractarias posterior al tratamiento. Cuando esta bacteria se encuentra en pequeñas cantidades es más fácil su erradicación; sin embargo, debido a su supervivencia excepcional que se puede deber a las condiciones adversas en las cuales puede influenciar su viabilidad durante periodos largos y prolongados, volviéndose resistente a la irradiación UV, calor, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrogeno, etanol y ácido; producto de su mecanismo de supervivencia cuando se expone a un estrés ambiental y resucita al volver a condiciones favorables.⁵⁶ Además de ello:⁴²

- Vive y persiste en un ambiente pobre en nutrientes para su supervivencia.

- Resistente a diferentes medicamentos como el hidróxido de calcio e irrigantes, tales como el hipoclorito de sodio.
- Capacidad de formar biofilms en conductos tratados con medicación.
- Invadir y metabolizar fluidos dentro de los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno.
- Convertir en un estado viable pero no cultivable; es decir, revivir si presenta condiciones favorables.
- Resistencia a los antibióticos como la vancomicina, que mediante pruebas bioquímicas convencionales ⁵⁷ identificaron y determinaron la susceptibilidad a la vancomicina siguiendo las pautas del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico usando el método de microdilución en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC).⁵⁸
- Sobreviven en ambientes extremos con pH bajo, alta salinidad y altas temperaturas.
- Sufren períodos prolongados de inanición y utilicen el fluido tisular que fluye del ligamento periodontal.

Asimismo, los enterococcus pueden crecer a 10°C y 45°C con un pH de 9,6 en un caldo de NaCl al 6,5% sobreviviendo a 60 °C durante 30 minutos. No obstante, puede someterse después de una preexposición a condiciones de estrés subletales, donde estos microorganismos se vuelven menos sensibles a los niveles normalmente letales de dodecilsulfato sódico, sales biliares, hiperosmolaridad, calor, etanol, peróxido de hidrógeno, acidez y alcalinidad.⁵⁶

La virulencia enterocócica de este microorganismo está asociado con diferentes factores, como la sustancia de agregación, adhesinas superficiales, feromonas

Este modelo se refleja en la Fig. 5, que al liberarse los factores de virulencia de la bacteria en el área perirradicular, provocan la atracción de leucocitos ó estimulan a que estos leucocitos produzcan mediadores inflamatorios o enzimas líticas, pudiendo algunas de estas bacterias traslocarse también a la lesión perirradicular. Asimismo, evidenciarse la adhesión de la bacteria a diversos elementos de la dentina como se observa en la ventana que expande una zona radicular y los productos de las bacterias representados en abreviaturas. Adh: adhesinas superficiales; AS: sustancia de agregación; Bact: bacteriocinas; BS: sustancia aglutinante; CP: péptidos de colágeno; Cilo: citolisina; Ef: *enterococcus faecalis*; Elas: elastasa; Gel: gelatinasa; Hya: hialuronidasa; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; IFN - \ gamma: interferón gamma; IL: interleuquina; LE: enzimas lisosómicas; LTA: ácido lipoteicoico; NO: óxido nítrico; O₂⁻: anión superóxido; PGE2: prostaglandina E2; SP: feromonas sexuales; y TNF: factor de necrosis tumoral.⁵⁶

2.2.4.4 Evaluación morfológica de la colonia

Una evaluación inicial de la morfología bacteriana es de gran importancia para esclarecer y decidir qué medidas serán tomadas en relación a la identificación y caracterizaciones definitivas del microorganismo. El éxito o fracaso de un procedimiento dependerá principalmente si se consideró como parte del estudio las características de una colonia como son: Tamaño de la colonia, Pigmentación de la colonia, Forma de la colonia, Cambios en los medios con agar como resultado del crecimiento bacteriano y el olor que pudiesen fomentar. Sin embargo estos criterios suelen ser subjetivos al igual que la variabilidad de términos utilizados por diferentes laboratorios.⁶⁰

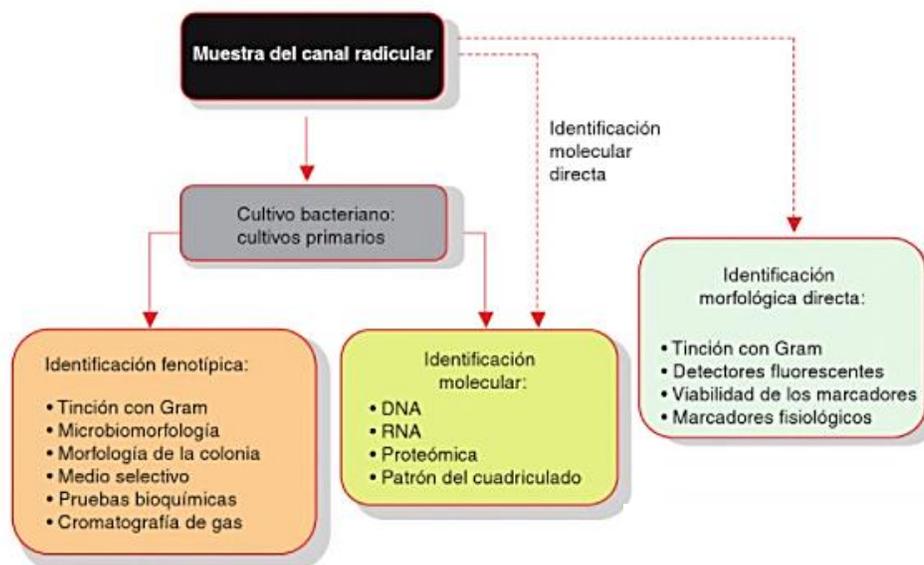


Fig 6. Protocolo para la visualización e identificación de microorganismos endodónticos. (Obtenido de Bergenholtz *et al*, 2011)

2.2.4.4.1 Tinción Gram

Este tipo de tinción en conjunto con la evaluación microscópica y la morfología de las colonias sirven para obtener los pasos de identificación requeridos y evitar confusión entre diferentes microorganismos provenientes de cada colonia, puesto que todos no presentan una morfología diferente en la placa primaria.⁶⁰

A partir de esta placa todos los demás procedimientos requieren de cultivos puros para la identificación definitiva de la cepa. Una tinción Gram del crecimiento bacteriano a partir de colonias aisladas de diversos medios es el primer paso de cualquier esquema para identificar y dividirlos en cuatro grupos como: cocos grampositivos, cocos gramnegativos, bacilos grampositivos o bacilos gramnegativos.⁶⁰ Así como ser usado en procedimientos confirmatorios, posterior a la reactivación de cepas pertenecientes a los grupos anteriormente mencionados.²¹

2.2.4.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En las últimas décadas se han implementado nuevas técnicas de identificación bacteriana de base molecular; tal es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa con sus siglas en inglés PCR. Este método ha evidenciado una ventaja importante en la identificación y clasificación de microorganismos; analizadas en la microbiota endodóntica, pero sin conocer su vitalidad debido a que presenta esta limitación,⁵⁹ por tal motivo diferentes estudios adjuntan otras pruebas para la evaluación de su supervivencia bacteriana como el LIVE/DEAD.¹⁶

2.2.4.5 Antibiograma

Son estudios que se ejecutan de forma *in vitro*, permitiendo determinar la resistencia o sensibilidad de los microorganismos frente a distintos antimicrobianos. Se requiere en las siguientes situaciones: ⁵⁹

- Cuando se desconoce la sensibilidad a los antimicrobianos de uso frecuente en un microorganismo aislado.
- Como medio de vigilancia epidemiológica de microorganismos resistentes que son evaluados e informados de acuerdo con su evolución.
- Para infecciones graves que comprometan la salud general del paciente.
- Cuando no se evidencia el cese del cuadro clínico. Dejar 72 horas antes el tratamiento para su posterior evaluación mediante un antibiograma.

Entre los métodos más utilizados para determinar qué antimicrobiano selectivo es más eficaz son: dilución en agar, difusión en agar y dilución en caldo, siendo los dos últimos los más utilizados. ⁵⁹

2.2.4.6 Métodos de determinación de la sensibilidad

Las fases de los medios de crecimiento bacteriano son divididos en: sólida como el agar y líquida como el caldo. En ciertas ocasiones se propone el uso de un medio bifásico que presenta ambas fases dentro de su proceso.⁶⁰

2.2.4.6.1 Difusión con discos

Este método elaborado en un medio sólido requiere de un agente solidificante añadido a los nutrientes y al agua. El agente utilizado con mayor frecuencia es la agarosa que presenta una propiedad particular de fundirse a altas temperaturas ($\geq 95^{\circ}$ C) y volver a solidificarse a temperaturas bajas de 50° C, ideal para ser distribuido en placas Petri y formar un agar placa posterior a su enfriamiento. En su mayoría los diferentes tipos de agares se identifican de acuerdo con sus principales componentes nutritivos como por ejemplo, agar sangre de carnero, agar bilis esculina entre otros. De acuerdo con las óptimas condiciones de incubación se podrá observar sobre el medio de cultivo cada célula bacteriana en forma de colonias que presenten similares características genotípicas y fenotípicas.⁶⁰ La Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda como máximo el uso de doce discos en una placa de 150 mm; así como no más de seis discos en una placa de 100 mm, con una separación entre disco y disco de 24 mm, con la finalidad de otorgar una medición adecuada para el clínico. Las mediciones facilitadas por las zonas de inhibición pueden ser realizadas visualmente o con instrumentos sobre fondo negro iluminado con luz reflejada, con excepción de la vancomicina que deben leerse con luz transmitida, es decir, que la placa Petri esté sujeta a la fuente de luz. A partir del margen debe considerarse que no es una zona de inhibición bacteriana.⁵⁸ Entre los agares standards más utilizados como medio de cultivo para el crecimiento puro del *enterococcus faecalis* se han reportado:

a) Agar sangre

Se encuentra compuesto por agar tripticasa y soja, agar brucella o infusión de carne y corazón con 5% de sangre de carnero. Utilizado para el cultivo de ciertos microorganismos con requerimientos especiales de cultivo, presentando determinación de reacciones hemolíticas.⁶⁰ Este medio de cultivo es el más utilizado y reportado dentro de diferentes metodologías para la obtención del crecimiento puro de bacterias como el *E. faecalis*, para posteriormente ser nuevamente cultivados en otros medios selectivos que son trabajados en constantes estudios *in vitro*.^{16,17,18,19,21}

b) Agar bilis esculina con vancomicina

Uno de sus componentes es la azida, quien inhibe a bacterias gramnegativas, así como vancomicina para identificar las bacterias grampositivas resistentes y bilis esculina que selecciona a los *enterococcus* en vez de otras bacterias resistentes a la vancomicina.⁶⁰ Su aplicación ha sido reportada posterior al control de pureza sobre agar sangre y el cultivo en caldo como método standard para finalmente evaluar la inhibición que proporcionan ciertos medicamentos aplicados en endodoncia sobre bacterias persistentes como el *E. faecalis*.¹⁷

c) Agar Mueller-Hinton

Este medio es la base standard para probar la mayoría de microorganismos, que además contiene suplementos y sustituyentes necesarios para bacterias que requieren cultivos especiales. Factores como el pH, el contenido de cationes y el medio solido pueden alterar la medida exacta halos de los halos de inhibición; por eso sugieren que el medio no sea muy gruesa ni tan delgada, debido a que el espesor del agar afecta el gradiente de la concentración del fármaco antimicrobiano.⁶⁰ En relación

a bacterias Grampositivas como el *E. faecalis* se necesita un periodo de 48h a 37° C para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias UFC.²⁰

2.2.4.6.2 Dilución en caldo

Esta técnica tiene como finalidad determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), definida como la mínima concentración de un antimicrobiano que inhiba el crecimiento bacteriano. Este valor hace referencia a estudios de sensibilidad representando su actividad bacteriostática. Los medios líquidos contienen nutrientes que son disueltos con agua, donde las bacterias que sean inhibidas a bajas concentraciones con un antimicrobiano son denominadas sensibles; mientras las que precisan de concentraciones altas son consideradas resistentes y directamente asociadas con una baja probabilidad de éxito terapéutico.⁵⁹⁻⁶¹ La aplicación de esta metodología ha demostrado precisión y posee mayor valor clínico, pese a presentar alta complejidad, costo y tiempo prolongado; por ello únicamente es ejecutado en casos especiales.⁵⁹

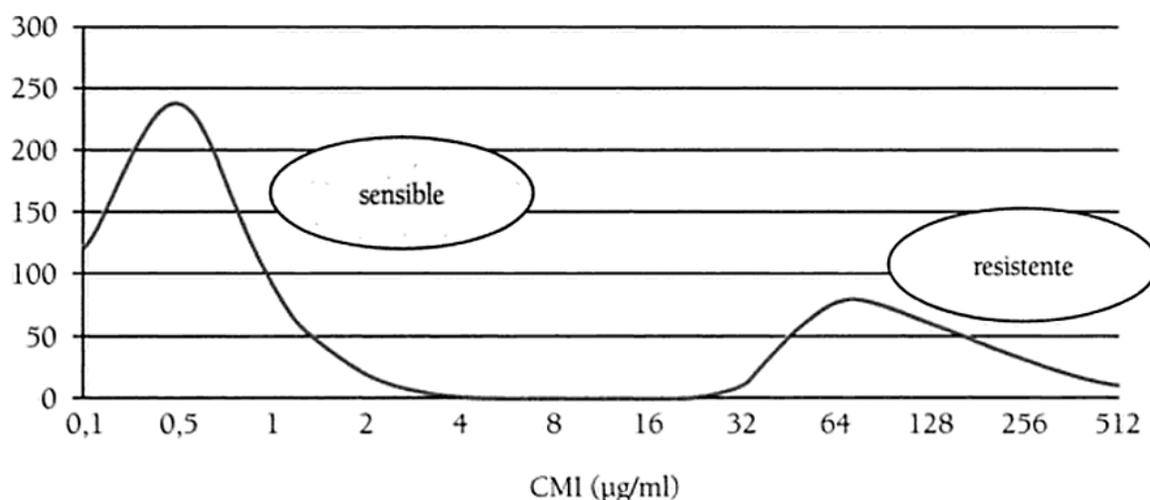


Fig 7. Ejemplo de distribución Biomodal de los valores de MIC obtenidos de un agente antimicrobiano frente a determinada cepa, donde se evidencia una zona sensible utilizando bajas concentraciones y una zona resistente con altas concentraciones de antimicrobiano. (Obtenido de Zaragoza R *et al*, 2007)

Técnica de Macrodilución

La identificación del crecimiento bacteriano presenta indicadores como la turbidez; es decir el cambio de limpio a turbio del caldo. Esto se debe a la deflexión de la luz por las bacterias presentes dentro del cultivo, esta turbidez aumenta de acuerdo a la proporción de bacterias encontradas.⁶⁰ Para ello se utiliza una secuencia de tubos con diferentes concentraciones de antimicrobiano inoculados con una suspensión estándar de la cepa ajustada de acuerdo con la Escala turbimétrica de McFarland que requiere 10^6 UFC/ml (Unidades formadoras de colonia por mililitro) de caldo como mínimo para observar la turbidez del medio bacteriano inoculado.^{7,16-19, 21,59,60} Esta prueba consiste en exponer a microorganismos a agentes antimicrobianos en el caldo de cultivo; los fármacos activos son expresados en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de caldo. Es importante contar con un control de esterilidad del medio de cultivo que no sea inoculado y otro control de crecimiento con inóculo que ayuden a determinar la ausencia o presencia de turbidez transcurrida las 18 horas a 35°C . Por otro lado, se obtiene la Concentración mínima bactericida (MBC) a partir del subcultivo de los tubos sin crecimiento bacteriano visible de la MIC, para evaluar la eliminación en un 99.9% del microorganismo.⁶¹ El rango de concentraciones probado para cada fármaco es en base a ciertos criterios como la concentración alcanzada en el suero del paciente. Además de la variación de un fármaco a otro, debido a sus propiedades farmacológicas. Asimismo se basa en el nivel de fármaco que se requiere para identificar de forma confiable un mecanismo de resistencia subyacente particular. En conclusión esta concentración de prueba para un fármaco puede variar de acuerdo con el microorganismo y las resistencias asociadas al realizar esta prueba. El rango standard probado para concentraciones de diversos antibióticos en una serie de diluciones al 1/2 por ejemplo 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, $0,25\mu\text{g}/\text{mL}$,

de todos ellos la menor concentración antimicrobiana que inhiba por completo el crecimiento bacteriano mediante métodos visuales, automatizados o semiautomatizados es denominada la concentración mínima inhibitoria (MIC).⁶⁰

a) Infusión Cerebro Corazón (BHI)

Este medio presenta un elevado contenido nutricional utilizado para diferentes microorganismos como el *E. faecalis*; presentado como agar o caldo que incluye o no sangre. Entre los ingredientes se encuentran la infusión a partir de diferentes fuentes de tejido animal, proteína, amortiguador de fosfato y una pequeña porción de dextrosa. La fuente de energía que presenta el hidrato de carbono coopera con el ingreso de las bacterias para su crecimiento. Sus principales aplicaciones se dan como principal componente de los medios desarrollados para cultivar las muestras de sangre obtenidas de pacientes con la finalidad de hallar las bacterias, también utilizada para identificar las bacterias y como pruebas de sensibilidad bacteriana a ciertos antimicrobianos.⁶⁰ La mayoría de estudios reportados dentro de su metodología hacen uso de este caldo estéril para el inóculo de bacterias como el *E. faecalis* que son cultivados inicialmente en agar sangre.^{7,16,17,18,19,21,60} Uno de los indicadores confirmatorios del crecimiento bacteriano es dado por la turbidez que se manifiesta en la literatura a las 24h^{15,16,20,21} ó a las 48h¹⁹ en condiciones de anaerobiosis a 37° C.

b) Caldo Tripticasa de Soja (TSB)

Es un caldo enriquecido que presenta diversas finalidades como el favorecimiento del crecimiento bacteriano de ciertos microorganismos con y sin necesidades especiales de cultivo; asimismo, es utilizado para el subcultivo de cuantitativas bacterias en cultivos primarios en placas agar.⁶⁰ De la misma que el BHI se requiere de colonias

cultivadas inicialmente en medios como agar sangre para finalmente ser inoculadas en TBS por 24h a 37° C.^{17,21}

2.2.4.6.3 Sistemas comerciales

La gran mayoría de métodos comerciales se realizan en base a variaciones de los métodos convencionales como la dilución en caldo o difusión con discos, comparado la precisión de ambas metodologías para corroborar el éxito mediante los resultados encontrados. Asimismo, muchos de estos sistemas comerciales hacen uso de medios de cultivo y condiciones atmosféricas utilizados en los métodos convencionales. Las diferencias marcadas que existen entre ambos métodos varían de acuerdo a:⁶⁰

- El modelo o formato utilizado para la recolección de bacterias y agentes antimicrobianos.
- El grado de automatización de la siembra, incubación, interpretación e informe de los resultados de distintos sistemas comerciales.
- El método a utilizar para inhibir el crecimiento del microorganismo.
- Y la exactitud del proceso y resultados.

2.2.4.6 Control de calidad en microbiología

El control de calidad de un laboratorio debe documentar y evaluar cada aspecto de los distintos procedimientos que se realicen; tales como: ⁶¹

- a) Control de calidad de las muestras clínicas: Es uno de los procedimientos más importantes que consta de la correcta selección, recolección y transporte de las muestras clínicas.

- b) Control de calidad para para medios: Los frascos de medio de cultivo deben estar registrados con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote, y fecha de abertura del producto. Antes de su uso frecuente deben ser inoculados y probados para evaluar su comportamiento, pudiéndose utilizar cepas ATCC, y finalmente registrar los resultados obtenidos. Si se desea determinar la concentración de timina/timidina se monitoriza utilizando la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el disco de trimetoprin sulfa. Entre las pruebas básicas de control de calidad para medios se encuentran la medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad de agar.
- c) Control de calidad de reactivos: Su registro de funcionamiento debe registrarse de forma diaria o cada vez que se realice una prueba.
- d) Control de calidad de las tinciones: Debe realizarse el control de calidad en cada nuevo lote, posterior a ello realizarse de forma semanal en microorganismos ATCC frescos correspondientes a cada tipo de tinción. Obteniendo el registro de y controles de cada lote nuevo de tinción.
- e) Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación: Deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen; asimismo analizar los controles positivo y negativo que se encuentran en cada juego de reactivos. Finalmente llevar un registro con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha de ingreso, fecha de abertura del kit y registrar los controles realizados.
- f) Control de calidad de la prueba de sensibilidad: La prueba debe ser monitoreada a través de su precisión y exactitud; así como el comportamiento

de los reactivos y el desempeño de las personas que realizan las pruebas y los resultados obtenidos. Se recomienda utilizar cepas ATCC para los diferentes pruebas de sensibilidad y registros de los nuevos lotes antes de su uso y luego una vez al mes.

- g) Control de calidad de equipos: Deben contener un control de calidad y mantenimiento preventivo y correctivo de acuerdo con el fabricante; asimismo debe registrarse el nombre del equipo, fecha, resultado y comentarios. Por otro lado, es importante contar con un manual de procedimientos operaciones de cada equipo dentro del laboratorio.
- h) Supervisión del personal: Es un factor importante dentro del control de calidad del laboratorio de microbiología. El personal debe estar en constante capacitación, actitud positiva y contar con lo necesario para desempeñar su labor. Cada trabajador debe contar con una ficha técnica de posibles accidentes que puedan suceder; así como las posibles infecciones que podrían obtenerse.
- i) Control de calidad externo: Se recomienda que los laboratorios participen de programas de evaluación externa, que mide la capacidad de laboratorio para medir una muestra desconocida y obtener un resultado seguro.

2.2.5 TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS PULPARES

El objetivo principal de la terapia pulpar sea en dentición decidua o permanente es mantener la integridad y salud de los dientes y tejidos circundantes, particularmente si se trata de un diente permanente joven con raíces inmaduras, afectado por caries, lesión traumática u otras causas que detienen el proceso de apexogénesis.² Los tratamientos de conductos desde la apertura hasta el sellado hermético de la zona

apical finalizado el trabajo, requieren de una serie de pasos para obtener el éxito, así como salvaguardar el bienestar del paciente. Dentro de ello existen dos procedimientos que siguen siendo motivo de estudios que son la irrigación, desinfección y material de obturación de los conductos, donde diversos autores manifiestan que son la clave del éxito de una terapia pulpar si es correctamente ejecutada bajo los protocolos establecidos.⁷ Asimismo, si presenta los siguientes requisitos según Holan:

- Bactericida
- Bacteriostático
- Antiflamatorios
- Inertes al tejido periapical
- Reabsorbible
- Radiopaco
- Biocompatible
- No provocar coloración al diente
- Remoción fácil si es necesario

2.2.5.1 IRRIGACIÓN QUÍMICA

Actualmente existen numerosos productos para la irrigación de conductos radiculares. La selección de un producto en particular se debe a las propiedades y efectos deseados que son observados en la clínica.⁶² El efecto químico de los irrigantes se verá significativamente influenciado por la concentración aplicada, la superficie de contacto entre el irrigante y el sustrato, el tiempo de contacto, el tipo de reactivo, el pH, la temperatura y la interacción que pueda generarse con otras sustancias químicas; se

recomienda que el irrigante utilizado se encuentre vigente para que garantice un efecto químico adecuado, debido a que los irrigantes se inactivan rápidamente cuando se encuentran en contacto con restos de tejido, dentina, microorganismos, así como con el mismo irrigante. De acuerdo con Zehnder, el irrigante ideal debe presentar las siguientes características:⁶³

- Como un amplio espectro antimicrobiano y una alta eficacia contra anaeróbicos y microorganismos facultativos que formen biofilm esencialmente.
- Disolución de restos de tejido pulpar
- Inactivación de la endotoxina
- Evite o elimine la capa de frotis formada durante la instrumentación
- Finalmente que sea biocompatible.

Aun cuando los procedimientos mecánicos instrumentales son responsables por más del 95% de la eliminación bacteriana del conducto radicular, esto no garantiza que la desinfección logre alcanzar los túbulos dentinarios y las áreas de difícil acceso. Por tal razón, es esencial el uso de elementos químicos que permitan lograr mayor limpieza y descontaminación.²⁸

En esta sección se enfocara a los irrigantes más reportados e utilizados con mayor frecuencia como desinfectante en el tratamiento de conductos.

2.2.5.1.1 Hipoclorito de sodio (NaOCl)

El NaOCl es un irrigante primario ampliamente utilizado en el tratamiento de conductos, debido a su acción antibacteriana y sobre biopelículas; así como la capacidad que presenta para disolver el tejido pulpar y los componentes orgánicos que presenta la capa de frotis. A pesar de la baja toxicidad utilizada clínicamente, el NaOCl

ha demostrado ser extremadamente caustico cuando entra en contacto con un tejido orgánico, incluso a concentraciones por debajo de 0,1% como se han demostrado en estudios *in vitro*.⁶³ Asimismo, puede ocasionar una reacción tisular si sobrepasa el foramen apical e inclusive cuando se derrame sobre los ojos del paciente.

Dentro de las propiedades que convierten al hipoclorito de sodio en la opción más adecuada como irrigante intraconducto son:^{29,63}

- Su excelente capacidad de limpieza
- Efectiva acción antibacteriana
- Neutraliza los productos tóxicos
- Disuelve el tejido orgánico
- Su acción rápida, desodorizante y blanqueante.

a) Efecto

El efecto que produce el hipoclorito de sodio queda inactivo rápidamente en presencia de un material oxidable, como por ejemplo los restos de dentina o material orgánico, debido a que lo disocia en Na^+ y Cl^- . Por tal motivo, los fabricantes y diversos estudios proponen el uso constante de NaOCl sin afectar las paredes del conducto radicular; así como el acompañamiento de movimientos de instrumentación o el uso de ultrasonido que cooperen con el proceso de disolución tisular.²⁹

b) Concentraciones

Las concentraciones utilizadas en endodoncia oscilan entre el 0,5% y 6% de NaOCl, donde actualmente no se establece una concentración estándar para el uso clínico, debido a la falta de estudios clínicos randomizados que sustenten el uso de grandes concentraciones de hipoclorito de sodio.^{29,63} Por ejemplo entre las más utilizadas en el tratamiento de conductos se encuentran:⁶⁴

- Solución de Dakin (0.5% de cloro activo)
- Solución de Milton (1% de cloro activo)
- Concentraciones medianas (2.5% de cloro activo)
- Altas concentraciones como la soda clorada (4-6% de cloro activo)

En EEUU se encuentran productos con concentraciones de 5.25%, pese a ser extremadamente caustico; sin embargo la mayoría de profesionales prefieren utilizar concentraciones diluidas como la de 2.5%, porque consideran que el porcentaje y grado de disolución se encuentra en función de la concentración del irrigante.⁵⁹

La capacidad del NaOCl de disolver el tejido orgánico están bien establecidas, por ello tanto el tejido vital como necrótico son afectados por este irrigante,²⁹ necesitando una baja a mediana concentración de NaOCl de 0.5%, 1% y 2.5% para el tratamiento en dientes vitales y de 1% a 5% en dientes necróticos.⁶⁴

2.2.5.1.2 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

La quelación se define como un proceso mediante el cual los compuestos químicos forman complejos solubles con ciertos iones metálicos, que unen los iones para que no puedan reaccionar con otras moléculas o iones. Durante el tratamiento de conductos, los agentes quelantes como el EDTA al 17% o el ácido cítrico al 30% se utilizan para disolver los componentes inorgánicos de la capa de frotis o residual que el NaOCl no pudo disolver.⁶³ Se ha reportado que la irrigación con EDTA coopera con la penetración de las drogas que compone la denominada pasta triple antibiótica y eliminan los restos calcificados hallados dentro de los túbulos dentinarios.¹¹ Favoreciendo a los materiales de obturación durante la fase final del tratamiento de conductos.⁶⁴

2.2.5.1.3 Clorhexidina (CHX)

La CHX es un antiséptico catiónico bacteriostático y bactericida, con una acción prolongada dependiendo de su capacidad de adsorción a las superficies, donde se libera pausadamente;⁶⁴ proceso denominado como sustantividad.²⁹ Presenta un amplio espectro antimicrobiano utilizado principalmente en odontología para el control de la placa química.^{63,64} Es una molécula hidrofóbica de carga positiva con alta afinidad a las moléculas cargadas negativamente presentes en las membranas celular o también al componente orgánico de los tejidos duros.⁶³

a) Efectos

Este agente penetra las capas externas de la pared celular de los microorganismos y ataca la membrana citoplasmática. Tiene la capacidad de coagular los orgánulos intracelulares de las células microbianas.⁶³ Como un solo irrigante en el tratamiento de conductos presenta la ventaja de no ser lesivo sobre los tejidos.²⁹ Sin embargo, también se ha reportado que al inhibir el crecimiento, la proliferación y la síntesis de colágeno de las células osteoblásticas; podría darse su extrusión hacia los tejidos periapicales, por ello aconsejan evitar estas situaciones; debido a que en esta zona se concentran estas células.⁶³

b) Concentraciones

Para el control de la placa se utiliza principalmente una concentración del 0,2%. La clorhexidina no tiene la capacidad de disolver los tejidos orgánicos, lo que impide su uso como irrigante principal del conducto radicular en endodoncia a bajas concentraciones. Como irrigador del conducto radicular, se usa principalmente una concentración alta de 2%. Asimismo, se ha evaluado su efecto citotóxico de forma in vitro en relación a las dosis aplicadas.^{63,64} A diferencia del hipoclorito de sodio se ha

comparado en un estudio en ratas que la CHX al 1% produjo mayor agresividad sobre el tejido conjuntivo de estos animales. El potencial irritativo moderado se confirmó hasta en concentraciones bajas de 0,12% según el estudio. A pesar de ser la CHX un antiséptico eficiente no logra superar las propiedades que ofrece el NaOCl, puesto que no posee la capacidad disolvente del tejido orgánico ni mayor biocompatibilidad.⁶⁴

2.2.5.2 MEDICACIÓN INTRARADICULAR

Asociación con antibióticos

2.2.5.2.1 PASTA TRIPLE ANTIBIOTICA

Antecedentes

El uso de antibióticos en endodoncia de manera local viene siendo estudiado desde el año de 1950. Los investigadores de esa década realizaron una combinación fármacos antibacterianos como la pasta poli antibiótica de Grossman que contenía penicilina, bacitracina o cloranfenicol y estreptomina. Por su ineficacia terapéutica contra bacterias anaerobias, años más tarde apareció una combinación de neomicina, polimixina y nistatina que fue evaluada para su efectividad, pero nuevamente se encontraron datos de que esta combinación de fármacos no diera resultados contra las bacterias ya registradas anteriormente.⁶⁵ La clindamicina también fue evaluada en lesiones de conducto radicular, no presentó éxito en ese momento contra los *enterococos*, los cuales se recuperaron 10 días más tarde de la colocación del antibiótico.^{33,39} Además no presentaba ninguna ventaja sobre el hidróxido de calcio.³³ En tanto con varios estudios realizados acerca de la mezcla de fármacos que cumplan con la eliminación de las bacterias encontradas dentro de los conductos radiculares infectados, se concluyó que no tuvieron mayor éxito hasta ese periodo de tiempo.

Un grupo de investigadores de origen japonés abordaron la problemática de la desinfección de los conductos radiculares bajo la teoría de la Esterilización de la lesión y Reparación de tejidos (LSTR) mediante una mezcla de antibióticos.⁸ Para abordar la diversidad de la microflora y la complejidad de las infecciones dadas dentro del conducto radicular, se demostró en primer lugar que el uso de un solo antibiótico no resultó eficaz en la desinfección de los conductos radiculares infectados;⁶⁵ es por tal motivo que se utilizó la mezcla de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina para erradicar la gran mayoría de bacterias localizadas en cierto tipo de patologías pulpares como la necrosis pulpar y dientes con lesiones periapicales de forma exitosa.⁸

Indicaciones

Estudios demuestran que la pasta triple antibiótica (TAP) es tratada a nivel clínico en dientes con abscesos/ fístula, reabsorción radicular patológica y/o dolor espontáneo. Radiográficamente si presenta radiolucidez en el área de la bifurcación y/o pérdida de hueso alveolar.⁸ Asimismo, dentro del proceso de revascularización esta pasta es utilizada como un agente antibacteriano durante el proceso con la finalidad de obtener un conducto radicular desinfectado y en óptimas condiciones.^{3-6,13,14,32}

Contraindicaciones

En dientes deciduos con piso de cámara pulpar perforado. Radiográficamente que presente excesiva reabsorción interna, excesiva pérdida de hueso alveolar a nivel del área de la bifurcación que implique al germen dentario y en dientes que no puedan restaurarse.^{8,65}

2.2.5.2.2 Antibióticos locales

Este tipo de aplicación de antibióticos tuvo gran apogeo desde hace 40 años.⁶⁵ La declinación se debió a la inaccesibilidad para la irrigación y el proceso de limpieza dentro de los conductos radiculares. Con la combinación de estos medicamentos de forma local se espera reducir el número de bacterias presentes y la mejora de la salud periapical.⁶⁶

2.2.5.2.3 Composición de la Pasta Triple Antibiótica

Entre los antibióticos de amplio espectro que componen la denominada pasta triple antibiótica (TAP), pasta triantibiótica o pasta 3Mix-MP se encuentran:

a) Metronidazol

Es un antibiótico que pertenece a la familia de los nitromidazoles con una actividad *in vitro* que desestabiliza el doble hélice de DNA; así como la ruptura de hebras de una amplia variedad de parásitos protozoarios y anaerobios mencionados en el capítulo de microbiología endodóntica. De igual forma ha demostrado actividad antimicrobiana contra cocos anaeróbicos y bacilos anaeróbicos gramnegativos como los bacteroides y bacilos, donde presenta un efecto bactericida al inhibir la síntesis de ácidos nucleicos en bacterias anaerobias estrictas, independientemente de la fase de crecimiento bacteriano.⁶⁷ Sin embargo también se ha reportado su ineficacia contra bacterias aerobias y anaerobias facultativas, por ello recomiendan combinarlo con una penicilina, una cefalosporina o un macrólido. En tanto, si la penicilina es ineficaz después de 48 a 72 horas, el metronidazol es un agente antimicrobiano valioso para la terapia con antibióticos de combinación.⁶⁸

b) Ciprofloxacino

Es la fluoroquinolona más potente de la primera generación frente a bacilos aerobios gramnegativos como como las enterobacterias y *Neisseria*. La concentración mínima inhibitoria que requieren estas bacterias son de 0.1 mg/mL, mientras que las bacterias grampositivas necesitan de concentraciones más altas. Estos antimicrobianos ejercen un efecto bactericida inhibiendola enzima de ADN girasa bacteriana, una enzima necesaria para la replicación del ADN y algunos aspectos de la transcripción, recombinación y transposición.⁶⁷

c) Minociclina

Es una tetraciclina de amplio espectro que actúa contra una amplia gama de bacterias periodontales, debido a que estos patógenos invaden el conducto radicular y los tejidos periapicales.⁶⁸ Son también eficaces contra algunos microorganismos resistentes a antimicrobianos activos contra la pared bacteriana.⁸ Las tetraciclinas son de uso limitado en niños menores de 8 años, ya que podría instaurarse en la dentina secundaria ⁶⁵ y causar la decoloración dental.^{5,8,12-14,22}

Vehículos

a) macrogol

Es un vehículo de uso fármaco-dermatológico; su consistencia varía según la longitud de la cadena: polietilenglicol 300 es líquido, polietilenglicol de 400 es semisólido, y el de 4000 es sólido. La consistencia observa en diferentes estudios es la sólida de 4000, que es la ideal para el uso clínico como uno de los vehículos que componen la pasta triple antibiótica (TAP).^{8,21,65}

b) Propilenglicol

El propilenglicol (1,2-propanodiol), alcohol dihidrico, es un vehículo que tiene un gran potencial para el uso en el tratamiento de conducto. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, presenta un peso molecular de 76,09. Se ha informado que es un vehículo ampliamente utilizado para diversos productos farmacéuticos y comerciales tales como medicamentos, cosméticos y alimentos. Este producto ha sido utilizado para detección de la caries como el caries Detector®; y en diferentes estudios de endodoncia como un vehículo para el Hidróxido de calcio.⁶⁹

El propilenglicoles esencial dentro de la TAP, debido a que penetra el sistema de conductos radiculares rápidamente y con mayor eficacia por los túbulos dentinarios, lo cual indica su potencial eficacia en la penetración de los medicamentos compuestos por la pasta triple antibiótica.^{8,21,65,69}

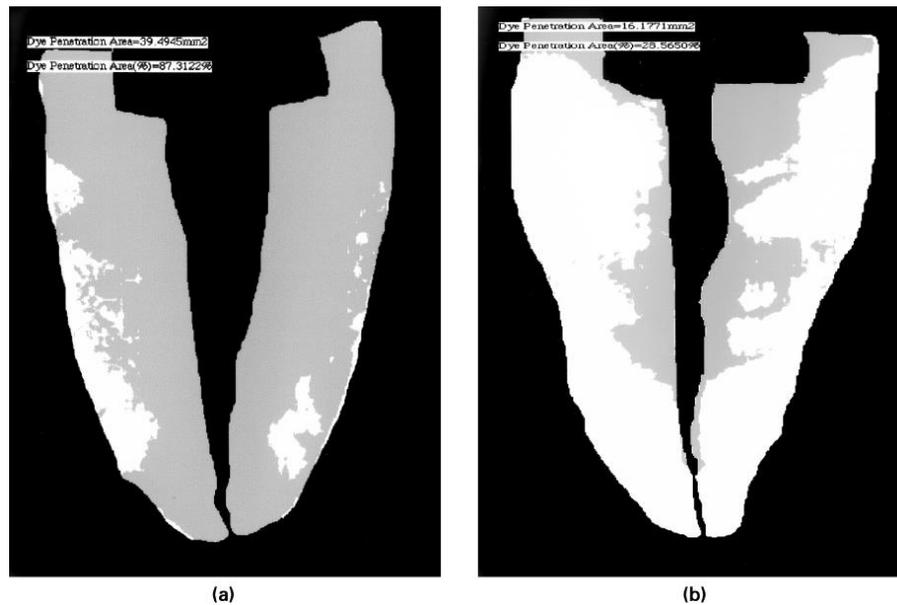


Fig 8. Mediante un análisis de imágenes se observa en la imagen (a) mayor penetración de propilenglicol sobre el área superficial, mientras que la imagen que contuvo agua destilada (b) en menor porcentaje. (Obtenido de Cruz E *et al*, 2002)

2.2.5.2.2 PASTA“CTZ”

La pasta CTZ ha sido estudiada por Denari en 1996 en molares primarias con compromiso pulpar mediante la Terapia endodóntica no instrumentada (NIET) que fue propuesta por Soller y Cappiello en 1959.⁷⁰ Un estudio comparativo reciente determinó que la pasta CTZ obtuvo excelentes resultados a nivel clínico en molares primarios con necrosis pulpar de 28 pacientes pediátricos, quienes fueron controlados clínica y radiográficamente a los 6 y 12 meses del tratamiento eliminando la radiolucencia presentada antes del procedimiento.⁷¹

Componentes de la pasta CTZ

Está compuesta por tetraciclina de 500mg, una porción de cloranfenicol de 500mg, dos partes de óxido de zinc tipo I de 1000mg y una gota de eugenol. Tanto la tetraciclina como el cloranfenicol son antibióticos de amplio espectro que han demostrado eficacia sobre microorganismos gram+ y gram- , incluyendo hongos como la candida albicans.^{71,72}

a) Tetraciclina

Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas que impide la unión de RNA-transportador a la subunidad de ribosomas de 30S o 40S.^{67,72} La principal desventaja que presenta en los dientes es la pigmentación intrínseca o hipoplasia del esmalte que se produce durante la osteogénesis u odontogénesis, debido a su administración oral. Entre los factores que producen estas pigmentaciones se encuentran: la dosis, duración del tratamiento, grado y actividad de mineralización del diente.⁷²

b) Cloranfenicol

Es un antibiótico bacteriostático, que es obtenida a partir de *Streptomyces Venezuelae*, fue descubierta por Burkholder en 1947. Inicialmente no reportaron efectos de

toxicidad en relación a su administración. Años más tarde Clarke en 1967 evaluó la relación de la anemia aplásica y su consumo por más de un año de cloranfenicol. Tal es el motivo que la Asociación Médica Americana y la Food and Drug Administration plantearon un esquema de monitoreo en relación a los eventos adversos que pudiese presentar este medicamento.⁷²

c) Óxido de Zinc – Eugenol

Esta combinación es de uso particular en odontopediatría que viene siendo utilizado por décadas como pasta de obturación en conductos radiculares de dientes primarios. Su capacidad antiséptica que presenta actividad bactericida, analgésica y antiinflamatoria hace de esta combinación su vigencia hasta la actualidad.⁷²

2.2.5.2.3 PASTA GUEDES-PINTO

Descrita por el Dr. Guedes – Pinto en el año de 1981, quien dentro un trabajo clínico evaluó la eficacia de la pasta en 45 dientes con pulpa dañada; realizando seguimientos por el periodo de un año, obteniendo una tasa de éxito del 98% de toda la muestra tratada. Demostraron que la pasta Guedes-Pinto presentó propiedades:⁷³

- Antisépticas sin dañar los tejidos
- Reabsorción rápida al entrar en contacto con el tejido conectivo, en caso de extravasación
- Moderada reacción inflamatoria posterior al tratamiento
- Remoción fácil
- Radiopacidad

Componentes de la Pasta Guedes-Pinto

Los tres componentes son mezclados en proporciones iguales.^{71,73}

a) Yodoformo

Es un antiséptico bacteriostático compuesto básicamente por yodo, hidrógeno y carbono.

b) Paramonoclorofenol Alcanforado

Es uno de los antisépticos comúnmente utilizados con fines endodónticos, derivados de radicales libres como el fenol y cloro.

c) Rifocort

Utilizado en la rama dermatológica como una cremacompuesta por acetato de prednisolona y rifamicina.

2.2.5.3 ACCIÓN DE LA MEDICACIÓN INTRACONDUCTO

Terapia “LSTR”

Hace más de dos décadas la Unidad de Investigación de Cariología de la Universidad de Niigata desarrolló el concepto terapéutico denominado “esterilización de la lesión y reparación de tejidos” con sus siglas en inglés LSTR. Esta terapia consiste en el uso de una mixtura de drogas o medicamentos antibacterianos para la desinfección de lesiones infecciosas habitadas en la dentina, pulpa y lesiones periapicales con gran contenido de microorganismos patógenos; esta reparación de los tejidos dañados podría esperarse si las lesiones son desinfectadas mediante este proceso. Para la selección de los medicamentos que forman parte de la pasta triple antibiótica se han realizado diversos estudios a lo largo de este periodo con la finalidad de hallar la combinación ideal que erradique las bacterias predominantes de caries dental y

lesiones de origen endodóntico. En un inicio plantearon el uso único de un antibiótico bactericida de amplio espectro como es el metronidazol; sin embargo no observaron mayor éxito sobre bacterias anaerobias quienes comúnmente habitan en estas lesiones infecciosas. La resistencia de algunos patógenos sobre el metronidazol produjo la combinación de dos antibióticos bacteriostáticos como el ciprofloxacino y la minociclina, los cuales evidenciaron resultados *in vitro* de forma exitosa. A partir de ese momento la combinación de estos tres medicamentos denominados 3Mix logro erradicar bacterias orales que incluían algunos patógenos encontrados en lesiones endodónticas de dientes primarios ^{8,10,11,40,41} y como parte del protocolo de desinfección de dientes permanentes jóvenes en la regeneración endodóntica.^{2,3-6,14,24,32}

Tratamiento “NIET”

La combinación de la TAP en conjunto con vehículos como el macrogol y propilenglicol; trabajado bajo el concepto de LSTR permite que la terapia pulpar sea elaborada clínicamente bajo el tratamiento endodóntico no instrumentado (NIET), con la finalidad de erradicar la infección sin necesidad de retirar el tejido necrótico de la cámara pulpar, que en diversas situaciones por la complejidad de la anatomía radicular, las innumerables ramificaciones y la rápida diseminación de las bacterias de la cavidad oral que atraviesan la capa del esmalte con un grosor delgado en dientes primarios, torna dificultoso culminar con éxito el tratamiento en pacientes odontopediátricos; así como complicar la estadía del diente primario el tiempo necesario en la cavidad oral hasta su exfoliación fisiológica.^{8,13} Por otro lado, no retirar el barro dentinario que se encuentra en las paredes del conducto de los dientes

permanentes jóvenes, quienes contienen proteínas de factores de crecimiento endógenos, los cuales son encargados de conducir a la células madres mesenquimales para que posteriormente se diferencien; de tal forma que con la ayuda del MTA continúen con la apexificación radicular de forma fisiológica en base a la ingeniería tisular.^{2,9,74}

MEDICACIÓN INTRARADICULAR EN DIENTES PRIMARIOS

Los odontopediatras a menudo se enfrentan al manejo de dientes primarios con signos de pulpitis irreversible o necrosis pulpar. Entre las opciones de tratamiento tradicionalmente aceptadas de conductos radiculares infectados o tejidos perirradiculares están la pulpectomía o extracción.² Aunque la extracción de un diente primario sigue siendo una opción viable para mantener el espacio hasta su exfoliación fisiológica; se ha observado en estudios comparativos que un diente primario restaurado con éxito es mejor mantenedor de espacio que un tratamiento con aparatología. Los resultados a largo plazo mediante la pulpectomía en dientes primarios necróticos o con absceso han presentado resultados de aproximadamente el 85% de permanencia en la cavidad oral,¹³ pudiendo deberse el margen de error a la presencia de complejidades anatómicas de los conductos radiculares en esta dentición y por consiguiente las limitaciones del acceso de instrumentos e irrigadores.⁷⁵ No obstante, la técnica puede ser muy desafiante debido a los cambios continuos en el foramen apical como resultado de la absorción fisiológica y/o patológica. Asimismo, la instrumentación puede dañar el desarrollo del germen dental permanente.¹³ Por otro lado, estudios como los de Wang determinaron que incluso después de una limpieza química con hipoclorito de sodio al 6%, identificaron biofilms maduros de *E. faecalis*

con LIVE/DEAD hasta en un 46% de los conductos, demostrando que no es suficiente altas concentraciones de un irrigante químico sobre esta cepa resistente.⁷

Entre las consecuencias principales de la pérdida prematura de dientes primarios se han reportado:⁷⁵

- Pérdida de espacio para el diente permanente
- Erupción ectópica del diente sucesor
- Alteración en la secuencia de erupción
- Hábitos parafuncionales como deglución atípica por pérdida de dientes anterosuperiores
- Respiración bucal
- Alteración y deterioro de la fonación

Pastas de obturación en dentición primaria

Numerosos estudios han descrito indicaciones, contraindicaciones y técnicas para el tratamiento de conductos radiculares en dentición primaria que presentan pulpas infectadas o necróticas. A pesar de ello, actualmente no existe un consenso en relación al material “ideal” de obturación. Entre las pastas de obturación más utilizadas y reportadas en la literatura que se encuentran asociadas a antibióticos para terapia pulpar de dentición primaria están la pasta triple antibiótica, pasta CTZ y la pasta Guedes-Pinto.

a) Pasta triple antibiótica “TAP - Trimix - 3Mix-MP”

Para evitar las diferentes situaciones anteriormente mencionadas, Hoshino y cols. hace más de dos décadas aproximadamente planteó la terapia LSTR en dientes primarios en un inicio. Esta técnica no instrumentada obtuvo excelentes resultados

mediante trabajos in vitro ex vivo y clínicos randomizados como los de Takushige y cols., donde el concepto de LSTR aplicaron en un ensayo que incluyó 87 molares primarias infectadas de 56 pacientes que oscilaban entre 4 - 18 años de edad. Donde 83 de los 87 casos fueron asintomáticos posterior a una semana de la aplicación de 3-Mix-MP, con un tiempo de control del estudio de 680 días. El éxito se describió de la siguiente manera: sin movilidad, diente funcional y sin dolor o infección; logrando: ^{8,13,75}

- Terapias pulpaes atraumáticas
- Evitar trastornos psicológicos y de Ansiedad
- Sesiones cortas de terapia
- Bajo costo
- Accesibilidad de materiales

Preparación de medicamentos

Los medicamentos que componen esta pasta, se encuentran de forma genérica como ciprofloxacino, metronidazol y minociclina. Antes de su uso se debe retirar la cubierta entérica de revestimiento que cubren a los antibióticos. Cada uno de los medicamentos se pulveriza en 3 diferentes morteros de porcelana con su respectivo pilón y se almacena en recipientes herméticamente cerrados para evitar la exposición a la luz y la humedad, manteniéndose refrigerado a temperatura de 16° C. Los antibióticos al usarse deben encontrarse a temperatura ambiente. La mezcla de antibióticos en polvo se realiza en proporción ciprofloxacino, Metronidazol y minociclina 1:3:3, respectivamente otros estudios lo realizan en proporción 1:1:1. La preparación de la pasta es ejecutada en dos tiempos: Primero se realiza la mezcla de los antibióticos,

dividiendo en 7 proporciones iguales; mientras que el Macrogol con el Propilenglicol (MP) en proporción 1:1 que finalmente son mezclados.⁶⁵

Aplicación clínica

Para la técnica de esterilización de la lesión y reparación de tejidos (LSTR), se recomienda anestesia local y aislamiento con dique de goma. Se procede a retirar el techo de la cámara pulpar, continuando con la extirpación parcial o total de la pulpa.⁶⁵

- Anestesia local con lidocaína al 2%
- Colocación de aislamiento absoluto
- Eliminación de la pulpa necrótica a nivel de cámara pulpar(extirpación parcial) con fresa redonda grande y curetas
- Irrigación con suero fisiológico ó EDTA.
- Realizar una cavidad en la entrada de los conductos de 1 mm de profundidad y 2mm de diámetro
- Si hubiese sangrado en los conductos, aplicar hipoclorito de sodio al 10% embebido en una bolita de algodón
- Aplicar la pasta en la cavidad realizada a la entrada de los conductos
- Colocación con Cemento ionómero de vidrio a nivel de cámara pulpar
- Restauración con resina compuesta
- Todo el procedimiento es una sola sesión
- Control radiográfico hasta la exfoliación del diente primario

Entre los innumerables estudios que reportan el uso de la pasta triple antibiótica como material de obturación con asociaciones antibióticas en dientes primarios; el estudio

clínico randomizado mas citado fue el ejecutado en 2004 por Takushige y colaboradores, que incluyó 87 dientes de 56 pacientes entre los 4 y 18 años de edad. Aplicaron la técnica no instrumentada bajo el concepto de la terapia LSTR, como se observa en la Figura 9. Los controles postratamiento a la aplicación de la pasta antibiótica oscilaron entre 68 y 2,390 días equivalente a 2 meses y 6.5 años;⁸ siendo el estudio con mayor tiempo de control propuesto, según una revisión bibliográfica elaborada hasta el año 2012.⁶⁵

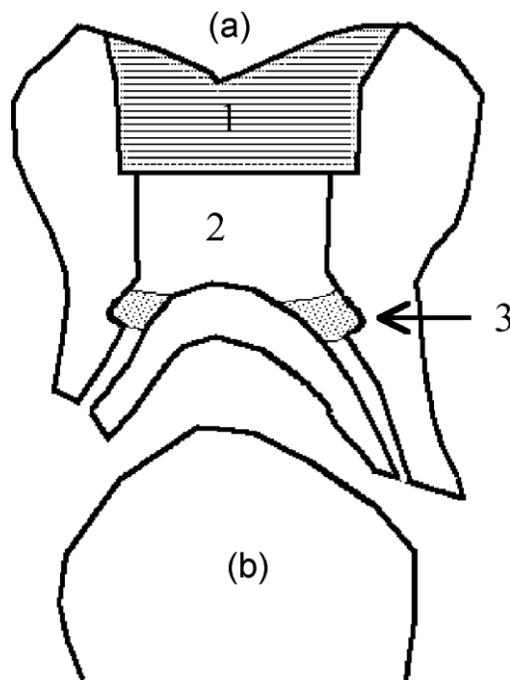


Fig 9. Esquema de la aplicación de la TAP. a. Diente deciduo 1. Incrustación de resina. 2. Relleno con cemento ionómero de vidrio. 3. Preparación cavitaria para la colocación de medicamentos con TAP. b. diente permanente sucesor. (Obtenido de Takushige *et al*, 2004)

a) Pasta“CTZ”

Dentro de las investigaciones más representativas se encuentra la realizada por Whalter en 1965; donde aplicó la pasta CTZ a 216 molares primarias, pertenecientes a 116 pacientes. Este estudio clínico y radiográfico considero como exitoso el tratamiento a aquellos órganos dentarios que no presentaron sintomatología alguna dentro de los 6 primeros meses. Observándose posterior a este periodo excelentes resultado como la desaparición de la lesión clínica; mientras que los resultados radiográficos no fueron los mejores, debido a la destrucción de la lámina dura a nivel de la cámara pulpar, así como signos de resorción interna.⁷⁶

Estudios actuales como los de Siegl y Gonzales constataron el éxito clínico y radiográfico del uso de la Pasta CTZ en dentición primaria, incluyendo la estabilización de la lesión periapical.^{71,72}

b) Pasta GUEDES-PINTO

Estudios recientes han constatado la eficacia antibacteriana de esta pasta utilizada en dientes primarios; sin embargo no se ha observado la reducción de radiolucidez en el área de furca, donde principalmente se identifica las lesiones periapicales. Determinaron en este estudio comparativo que la pasta CTZ proporcionó una mejoría a nivel de la zona de furcación a diferencia de la Pasta Guedes-Pinto, que no mostró disminución de radiolucidez a nivel de furca posterior a los 12 meses de su aplicación.⁷¹

Estudios clínicos	Takushige et al. (2004)	Prabhakar et al. (2008)	Takushige et al. (2008)	Nakornchai et al. (2010)	Pinky et al. (2011)	Agrawal et al. (2011)	Trairatvorakul and Detsomboonrat (2012)
Edad del grupo (años)	4-18 años	4-10 años	No especifica	3-8años	4-10 años	4-9 años	3-8 años
Selección del diente primario	Dientes anteriores/molares superiores e inferiores	Molares inferiores	No especifica	Molares superiores e inferiores	Molares inferiores	Molares inferiores	Molares inferiores
Numero de dientes (participantes)	87 dientes (56 pacientes)	60 dientes (41 niños) Grupo A: 30 dientes Grupo B: 30 dientes	360 dientes	50 dientes (37 niños) Grupo 3Mix: 25 dientes Grupo Vitapex: 25 dientes	40 dientes (28 niños) Grupo A: 20 dientes Grupo B: 20 dientes	60 dientes (34 niños) Grupo 1: (ZOE): 20 dientes Grupo 2: (pulpotomía) 20 dientes Grupo 3: (3Mix): 20 dientes	80 dientes (58 niños)
Intervención/técnica	Técnica pulpotomía	Grupo A: técnica pulpotomía Grupo B: técnica pulpectomía	Técnica pulpotomía	Técnica pulpotomía	Técnica pulpotomía	Técnica pulpotomía	Técnica pulpotomía
Medicación cavitaria	Si	Si	No	No	Si	No	Si
Proporciones de drogas utilizadas	1:3:3	1:3:3	1:3:3	1:1:1	1:3:3	1:3:3	1:1:1
Irrigantes/desinfectantes	Ácido fosfórico	Solución salina	EDTA	Hipoclorito de sodio	Solución salina	No especifica	EDTA
Restauración permanente	Cemento ionómero de vidrio seguido por una restauración compuesta inlay	Cemento ionómero de vidrio seguido por una restauración compuesta	Cemento ionómero de vidrio seguido por una restauración compuesta inlay	Cemento ionómero de vidrio seguido por una corona de acero inoxidable	Óxido de zinc eugenol – cemento ionomero de vidrio seguido por una corona de acero inoxidable después de 1 mes	Cemento ionómero de vidrio seguido de una corona acero inoxidable después de 24 horas	Cemento ionómero de vidrio/resina compuesta /corona acero inoxidable
Periodo de seguimiento	68-2,390 días equivalente a 2 meses – 6.5 años	12 meses Control 1,6 y 12 meses	123-2,065 días de seguimiento	12 meses (control 1 sem, 6 y 12 meses)	12 meses (controles 3, 6 y 12 meses)	12 meses (controles 1,3, 6 y 12 meses)	24-27 meses

Tabla de estudios clínicos en base a la terapia LSTR en dentición primaria. (Adaptada de Kayalvizhi et al 2013)

MEDICACIÓN INTRARADICULAR EN DIENTES PERMANENTES CON APICE

INMADURO

La retención a largo plazo de un diente permanente requiere una raíz con una proporción favorable de corona / raíz y paredes dentinales que sean lo suficientemente gruesas como para soportar la función normal. Por lo tanto, la preservación de la pulpa es un objetivo principal para el tratamiento de la dentición permanente con ápice abierto. Un diente sin una pulpa vital, sin embargo, puede permanecer clínicamente funcional. El tratamiento final dependerá si la pulpa es vital o no, en función del diagnóstico clínico y pruebas auxiliares. En este contexto, de acuerdo con este estudio para que el proceso del cierre apical de dientes permanentes inmaduros no vitales culmine con éxito, la American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD) ha propuesto por muchos años el protocolo de la Apexificación para estos casos.² Sin embargo, diversos reportes de casos clínicos demostraron que los dientes sometidos a este proceso no completaron su desarrollo apical, dejando frágil la estructura radicular propensa a la fractura.²³ Por tal motivo, surgieron protocolos como la revascularización y actualmente denominada regeneración endodóntica que es trabajado bajo un concepto de ingeniería biológica. Para la comprensión y aplicación clínica de nuevos protocolos de regeneración endodóntica es necesario un conocimiento básico de la odontogénesis y el desarrollo radicular.

Clasificación del desarrollo radicular y apical

De una forma muy didáctica Patterson planteó en 1958 una clasificación en relación a los dientes con ápice abierto, que consta de cinco grados de acuerdo con el desarrollo

radicular hasta el cierre apical del órgano dental. Dicha clasificación se encuentra estrechamente relacionada con la transición de los estadios de Nolla 8, 9 y 10.^{21,77}

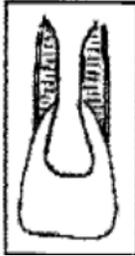
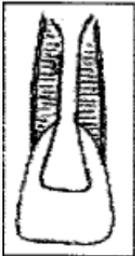
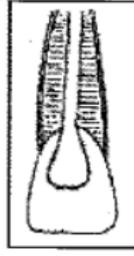
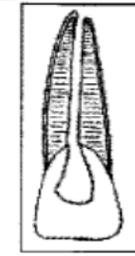
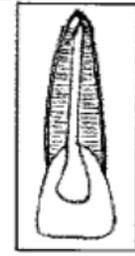
				
Grado 1 Raíz 2/3	Grado 2 Raíz 2/3	Grado 3 Raíz 3/4	Grado 4 Raíz completa	Grado 5 Raíz con cierre especial
Estadio 8 de Nolla		Estadio 9 de Nolla		Estadio 10 de Nolla

Fig 10. Clasificación de dientes con apice abierto. (Obtenido de Velásquez V, 2009)

Tratamientos

Para la comprensión de la conducta clínica a seguir es indispensable tener conocimiento de las peculiares anatómicas y dimensionales de la cavidad pulpar y conducto radicular en formación que presentan los dientes inmaduros con ápice abierto; así como un correcto diagnóstico del estado de la pulpa que llevara a escoger el tratamiento adecuado de los distintos procedimientos para dientes con pulpa viva o con pulpa mortificada.⁶⁴

Terapia en Pulpas Vitales	Recubrimiento Pulpar Indirecto Recubrimiento Pulpar Directo Pulpotomía
Terapia en Pulpas No Vitales	Apexificación Regeneración Endodóntica

APEXIFICACIÓN

La apexificación es un método que consiste en la inducción de una barrera calcificada, también denominada una barrera artificial en dientes inmaduros con ápices abiertos que presenten pulpa necrótica. Su efecto radica en la supresión de la pulpa mortificada y posteriormente el desbridamiento concienzudo del conducto radicular y la aplicación de un agente antibacteriano como el hidróxido de calcio y MTA.^{2,26,78}

Tratamiento con Hidróxido de calcio

El uso del hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] en combinación con el paramonoclorofenol alcanforado (CMPC) en ápice abierto fue ejecutado por primera vez por Kaiser en 1964 y popularizado por Frank; quien enfatizó la importancia de reducir la contaminación dentro del conducto radicular mediante la instrumentación y medicación con la finalidad de disminuir temporalmente el espacio del conducto con un tope de pasta reabsorbible.⁷⁹ El éxito del Hidróxido de calcio a lo largo del tiempo se debe al pH alcalino de 12.5 no fijado, que es un factor fundamental al estimular la formación de tejido mineralizado y fibroso a nivel de la zona apical del conducto radicular. Además de producir una necrosis estéril en múltiples capas, debido a la ausencia de microorganismos⁷⁸ que se encuentra relacionada con la liberación de iones hidroxilo, que son altamente oxidantes y muestran una reactividad extrema, ocasionando daño a la membrana citoplasmática bacteriana, desnaturalización de proteínas y afectación del ADN bacteriano, lo que permite la mineralización subyacente. Otro factor hallado que facilita los mecanismos de reparación es el aumento de calcio en el esfínter precapilar que reduce el flujo de plasma; además de afectar la enzima pirofosfatasa, que participa en la síntesis de colágeno.⁷⁹

A nivel histológico se han hallado en la barrera apical formada por el hidróxido de calcio, tejido conectivo fibrocolágeno denso irregular que contiene material extraño con fragmentos irregulares de calcificaciones altamente mineralizadas. Algunos estudios proponen una única aplicación entre 5 a 20 meses con controles clínicos y radiográficos;⁷⁹ mientras que otros autores sugieren el reemplazo regular del apósito de hidróxido de calcio, debido a que aumenta la velocidad de la formación de la barrera apical por un tiempo de 6 a 18 meses.⁷⁴ Entre los problemas frecuentes que se han reportado se encuentra:

- Seguimiento clínico y radiográfico a largo plazo
- Reemplazo del apósito de forma regular durante el periodo de tratamiento.
- Reinfeción del órgano dental
- Fractura de raíz a nivel cervical
- Resultados a largo plazo con información limitada.

a) Indicaciones del tratamiento

Este procedimiento puede realizarse si la formación pulpar ha fallado o estas otras razones no logran la regeneración pulpar.⁷⁴

b) Procedimiento

El tratamiento es iniciado por la organización, desinfección del conducto y conservación del área con el material biológico apropiado que proporcione una barrera apical, por un periodo de 6 a 18 meses con un reemplazo de la medicación intraconducto durante el tratamiento.^{74,80}

- Anestesia local
- Aislamiento absoluto del diente

- Apertura de la cámara pulpar a nivel la entrada de conductos
- Irrigación del conducto radicular (10 ml de hipoclorito de sodio al 2,5%)
- Secar con conos de papel
- Preparación de pasta de hidróxido de calcio con suero fisiológico
- Inserción de la pasta en la cámara pulpar y en la parte coronaria (tercera o media) del conducto radicular (con una bola de algodón)
- Colocación de obturación temporal
- Posterior a 30 días reemplazar el hidróxido de calcio
- Controles hasta los 18 meses posterior a la apexificación

Klein y Levy demostraron tener éxito al combinar el hidróxido de calcio con el Cresatin que presenta menor toxicidad a diferencia del formocresol y CMPC, debido a su bajo potencial inflamatorio como medicamento intraconducto. A partir de esta investigación, otros estudios revelaron la eficacia de misma magnitud reemplazando el CPMC por agua destilada o metilcelulosa; proporcionando este último una mejor solubilidad en fluidos tisulares y una firma consistencia física.⁷⁹

Tratamiento con Mineral Trióxido Agregado

El MTA es un polvo consistente con finas partículas hidrófilas de silicato tricálcico, óxido tricálcico y óxido de silicato que presenta baja solubilidad y ligera radiopacidad similar a la dentina, debido al óxido de bismuto; todo ello basado en el material de construcción cemento Portland. Desde su introducción en 1993 y aprobación como material de reparación endodóntico en 1998 por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha demostrado buena capacidad de sellado y

biocompatibilidad. Asimismo, una excelente propiedad antimicrobiana, debido al pH de 12.5 que presenta.⁷⁹

Torabinjad mediante la espectrofotometría, posterior al fraguado del MTA evidenció dos fases: La primera parecida a cristales discretos, formada principalmente por óxido de calcio y la segunda con apariencia amorfa sin cristales con aspecto granular y formada básicamente por fosfato de calcio. La composición media de los prismas es de 87% calcio y 2,47% sílice (SiO_2) y en las áreas de estructura amorfa, 33% calcio; 49 % fosfato; 2 % carbono; 3 % cloruro; 6 % sílice.^{77,81} Uno de los efectos adversos que ha producido el MTA ha sido la decoloración de los dientes permanentes inmaduros con ápice abierto, principalmente afectando la zona estética anterior.^{12,77} Esto fue producido por una pequeña porción de aluminio ferrato tetracálcio que presentaba el MTA gris que fue el primero en estar disponible para uso dental. Para superar este inconveniente efectuaron la eliminación de este componente durante el proceso de fabricación a través de una purificación.⁸²

a) Propiedades biológicas del MTA

Como ya se mencionó, el MTA es un material altamente alcalino lo que podría beneficiar sus propiedades biológicas en relación a la formación de tejido duro a nivel apical cooperando la regeneración casi completa del periodonto perirradicular en dientes no infectados. La biocompatibilidad del MTA es efectiva en todas sus aplicaciones endodónticas y bioactivo frente a los tejidos de la raíz del diente y más allá; como promover una baja inflamación perirradicular y provocar la formación de cemento en su superficie. Diferentes estudios que planearon estudiar la biocompatibilidad del material sobre células como los fibroblastos de ratas, hámster chino, perros y cobaya; resultaron con efectos citotóxicos negativos del MTA sobre

ellos. Observándose que dichas células se unen con facilidad al MTA endurecido y estimulando la producción de nuevos tejidos blandos y duros sin respuesta inflamatoria. Los estudios realizados en células humanas también han dado indicio a la proliferación de los osteoblastos al unirse al MTA. Otras células como los fibroblastos gingivales y periodontales han respondido favorablemente para mantener su forma y función en contacto con el MTA, el cual es relevante para el uso final del cemento radicular.⁸²

b) **Ventajas**⁸²

- Propiedades aceptables para el uso clínico
- Precio razonable
- Resistencia mecánica
- Capacidad de sellado aceptable
- Fácil esterilización
- Capacidad de establecerse en presencia de fluidos corporales
- Promueve la deposición del cemento
- No causa citotoxicidad al ligamento periodontal

c) **Desventajas**⁸²

- Tiempo de fraguado prolongado
- Textura granulosa, mediana dificultad de manipulación

d) Indicaciones del tratamiento

Este procedimiento puede realizarse si la formación pulpar ha fallado o cuando otras opciones terapéuticas no logran la regeneración pulpar a corto plazo.⁷⁴

e) Procedimiento

En base a su biocompatibilidad y capacidad selladora ha demostrado ser una buena opción en el tratamiento de apexificación de dientes permanentes inmaduros con apice abierto bajo el siguiente protocolo: ²⁶

- Aislamiento absoluto del diente
- Acceso cameral amplio
- Eliminación del tejido necrótico con un escariador o lima Hedstrom
- Evaluar la longitud de trabajo, sin llegar al ápice radiológico para no sobrepasarse
- Limpiar con una lima relativamente grande e ir ampliando
- Irrigar con hipoclorito de sodio sin eliminar la dentina
- Secar con puntas grandes de papel
- Mezclar el MTA polvo con el suero salino estéril
- Introducir el MTA en el conducto y compactar pluggers endodónticos
- Colocación de restauración permanente

La introducción de este material dentro de la endodoncia ha sido muy beneficioso para los pacientes con dientes permanentes inmaduros por causa de caries dental o traumatismo, y su futuro en el campo parece ser asegurado, debido a su éxito clínico.

REGENERACIÓN ENDODÓNTICA

El daño pulpar como consecuencia de traumatismos o caries en dientes inmaduros con ápice abierto puede ocasionar la pérdida de vitalidad y la detención del desarrollo radicular, resultando raíces cortas con paredes muy delgadas propensas a fracturas y complicando el tratamiento de conductos.^{4,26}

La terapia de endodoncia regenerativa brinda un enfoque de tratamiento alternativo basado en los principios biológicos de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. Este concepto se basa en reemplazar las estructuras dañadas, que incluyen las estructuras de la dentina y raíz, así como las células del complejo dentino – pulpar; como consecuencia de lesiones cariosas o traumatismo dental, que a menudo complican resolver un problema restaurativo debido a que la población más vulnerable son pacientes jóvenes, a quienes no se les puede colocar implantes dentales, puesto que su esqueleto craneofacial se encuentra en desarrollo.⁷⁴

La evolución de tal proceso regenerativo partió de experimentos que fomenten el coágulo sanguíneo dentro de la terapia endodóntica en conjunto con la compresión de la revascularización que es el restablecimiento de un suministro vascular al tejido pulpar existente, que es fundamental para finalizar el desarrollo total de la raíz.⁷⁴

Aunque el término de revascularización o revitalización pulpar aún es discutible; la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) ya planteó la denominación de Regeneración Endodóntica al proceso de revascularización con fines de una terminación universal.^{4, 74}

Ingeniería Tisular

Es un campo interdisciplinario que integra los principios de la biología y la ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que reemplacen o regeneren células, tejidos u órganos con la finalidad de reestablecer su actividad normal. Existen tres elementos básicos que conforman la ingeniería de tejidos; tales son: ⁷⁴

a. Células madres

Son células indiferenciadas que se están en constante mitosis. Existen dos tipos:

Células madres Embrionarias; estas son capaces de desarrollar doscientos tipos de células, pero su obtención es dificultosa.⁷⁴

Células madres de adulto o postnatal; pueden dividirse y crear otra célula a partir de ella misma; así como también una célula diferenciada de sí misma, con la diferencia que la otra célula dividida presenta capacidades limitadas. Definida como una célula multipotente que la diferencia de una célula embrionaria. Entre ellas encontramos: ^{9,74}

DPSCs	Células madre de pulpa dental
SHEDs	Células madres de dientes primarios humanos exfoliados
PDLSCs	Células madres del ligamento periodontal
DFPCs	Células madre progenitoras del folículo dental
SCAPs	Células madre de la papila apical

Informes recientes han descrito que la presencia de células madre mesenquimales con capacidades regenerativas en pulpas y tejido periapical inflamado presenta interesantes posibilidades aún para ser exploradas para el tratamiento del diente maduro con necrosis pulpar y periodontitis apical.⁷⁴

b. Scaffolds o andamios tisulares

Los andamios como parte de la ingeniería tisular sirven para dar soporte a la organización celular, proliferación, diferenciación y vascularización. Los estudios en base a procedimientos de regeneración endodóntica utilizan la dentina, así como el coagulo de sangre o el plasma rico en plaquetas (PRP) para proporcionar andamios a nivel del conducto radicular de los dientes permanentes inmaduros. Por otro lado, investigaciones más actuales han reportado el uso de andamios biodegradables elaborados de materiales naturales como el colágeno, ácido hialurónico, quitosano y quitina; así como las recientemente evaluadas con este fin, que son las nanofibras de hidrogel peptídico y diversos geles de fibrina que cumplen el papel de andamios en la ingeniería de tejidos de la pulpa dental.⁷⁴

c. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores en la célula y actúan como redes de señalización para inducir la proliferación y/o diferenciación celular. Los ejemplos de factores clave de crecimiento en la formación de pulpa y dentina incluyen la proteína morfogenética ósea, el factor de crecimiento transformante beta y el factor de crecimiento fibroblástico. Los procedimientos endodónticos regenerativos actuales dirigen sus investigaciones en utilizar los factores de crecimiento que se encuentran en las plaquetas y la dentina.⁷⁴

Base biológica de la Endodoncia Regenerativa

Uno de los efectos más desfavorables que reportaba la apexificación con hidróxido de calcio fue que alteraba las propiedades mecánicas de la dentina, debido a que su exposición desnaturaliza los grupos carboxilato y fosfato en la dentina, debilitando la

zona cervical de la raíz propensa a fracturas. Por el contrario la endodoncia regenerativa tiene el potencial de brindar un mejor desarrollo radicular pudiendo otorgar mejor pronóstico a largo plazo; logrando una regeneración del complejo dentinopulpar exitoso; así como un tejido vital capaz de generar una respuesta inmune y una señalización del daño tisular por las neuronas sensoriales.⁷⁴ Este hecho se basa en la hipótesis actual del rol fundamental que fomentan las células remanentes de la vaina epitelial de Hertwing o la diferenciación de las células madre de la papila apical²⁴ que son resistentes a las infecciones periapicales; por lo tanto, las redes de señalización de estas células residuales en dientes no vitales inmaduros no infectados estimulan diferentes células madre, incluyendo células madre papilares apicales, médula ósea y células madre pluripotentes de la pulpa para formar dentina y ayudar a la maduración fisiológica de la raíz.²⁰

Indicaciones del tratamiento de Regeneración endodóntica

Según la American Association Endodontics se debe tener presente al momento de ejecutar este procedimiento, lo siguiente: ⁷⁴

- Paciente joven
- Pulpa necrótica y que presente diente permanente inmaduro con apice abierto
- Mínima instrumentación o ninguna sobre las paredes dentinales
- Colocación de un medicamento intraconducto
- Formación de un coagulo de sangre o presencia de un andamio de proteína
- Sellado coronal eficaz

Procedimiento en la Regeneración endodóntica

El éxito de la regeneración endodóntica dependerá de tres elementos importantes como son la desinfección del conducto radicular, la presencia de andamios o *Scaffolds* (coagulo de sangre) y una restauración coronal hermética. Para ello, como se mencionó anteriormente se requiere de la presencia de células madre, *Scaffolds* y factores de crecimiento para la formación de un tejido funcional. Para llevar a cabo el proceso de manera exitosa, diferentes estudios han tomado importancia a la desinfección del conducto radicular, debido a que es requisito fundamental para la culminación de cierre apical.⁸⁰ Se han propuesto diversos antimicrobianos dentro del proceso de regeneración endodóntica; irrigantes como el hipoclorito de sodio (NaOCl)^{3,5-7,80} y clorhexidina;⁸² medicamentos intraconductos entre citas como el hidróxido de calcio ^{28,80} o pastas con asociaciones antibióticas. En una revisión sistémica reciente se encontró que el 80% de los estudios de regeneración endodóntica clínica y los informes de casos clínicos reportados utilizaron combinaciones de antibióticos como medicamentos intraconducto.¹⁶ Entre las asociaciones antibióticas más utilizada en regeneración endodóntica se encuentra la pasta antibiótica triple (TAP) que es tratada bajo el concepto de LSTR con un tratamiento endodóntico no instrumentado.^{2,5,6,14,24,32}

La regeneración endodóntica a menudo implica un procedimiento de dos o varios pasos a seguir. Básicamente la primera cita consiste en desinfectar los conductos radiculares, mediante el siguiente protocolo utilizando la TAP: ^{72,80,81}

- Anestesia local
- Aislamiento absoluto del diente

- Desinfección del diente con 10% yodopovidona antes de la apertura
- Apertura de la cámara pulpar a la entrada del conducto (pulpotomía)
- Irrigación del canal de la raíz con 20 ml de hipoclorito de sodio (1,25% -5,25%) y luego con suero fisiológico y finalmente con clorhexidina al 2%
- No instrumentar los conductos radiculares
- Lavar y secar el conducto radicular con conos de papel
- Aplicación de la pasta triple antibiótica en el conducto radicular
- Colocar una bola de algodón en la entrada del conducto radicular
- Sellar con una obturación temporal

En la segunda cita se obtiene un ambiente apto para la liberación de los factores de crecimiento de la dentina con la irrigación del EDTA; asimismo propiciar la liberación de células madre dentro del conducto radicular al estimular el sangrado formando un andamio tisular y recibir un restauración coronal permanente.^{74,80}

- Anestesia local sin vasoconstrictor
- Aislamiento absoluto
- Desinfección del diente con 10% yodopovidona antes de la apertura
- Acceso al conducto radicular
- Remoción de la pasta triple antibiótica usando irrigación con hipoclorito de sodio (1.25% -5.25%), luego con suero fisiológico y finalmente con clorhexidina al 2%
- Inducir una hemorragia apical. El nivel de sangre debe estar en la unión cemento-esmalte
- Preparación de agregado de trióxido mineral (MTA) y su colocación en el coágulo para formar un sellado hermético

- Introducción de una bola húmeda de algodón sobre el MTA
- Sellado de la cavidad con una presentación temporal

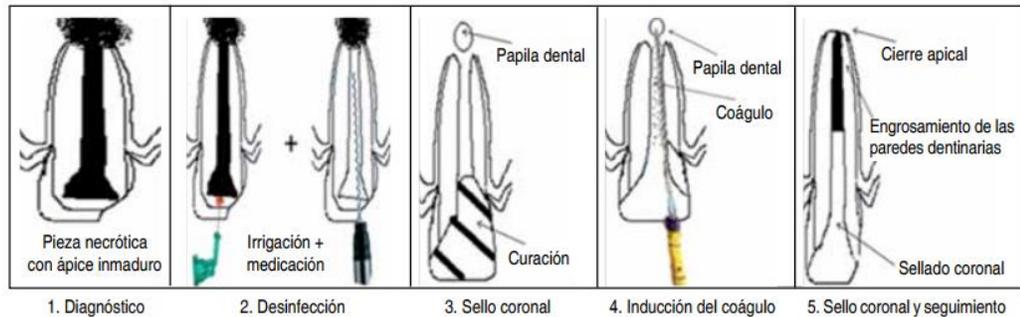


Fig 11. Procedimiento de la Rgeneración endodóntica en dientes permanentes inmaduros con apice abierto.

(Obtenido de Obando M *et al*, 2015)

Ventajas⁴

- Biocompatibilidad de las células sanguíneas del propio paciente para el tratamiento de regeneración endodóntica, evitando la transmisión de patógenos a partir de la sustitución de la pulpa utilizando la ingeniería tisular.
- Fácil adquisición de los medicamentos para la regeneración endodóntica
- Continuo desarrollo radicular y del fortalecimiento de la raíz como resultado del refuerzo de las paredes dentinarias reportado en diversos casos clínicos observado radiológicamente.

Desventajas⁴

- Algunos reportes clínicos han manifestado falta de continuidad significativa del desarrollo radicular, ausencia del cierre apical o la calcificación del conducto.
- Incertidumbre, si el tejido formado en la pared del conducto radicular es dentina o algún tejido de similar magnitud.
- Pigmentación dental, resistencia bacteriana, reacciones alérgicas.
- Reacciones alérgicas a la medicación intraconducto por parte de la TAP.

- Falta de un protocolo universal, hasta el momento el planteado por la AAE.
- Falta de periodos de seguimiento que van desde los 6 y 36 meses hasta los 5 años.

Complicaciones del uso de la TAP en Regeneración Endodóntica

Una de las etapas más importantes de la regeneración endodóntica es la desinfección del sistema de conductos. Para efectivamente eliminar esta infección producto de un diente necrosado o con lesión periapical, diferentes investigadores han utilizado pastas con asociaciones antibióticas entre ellas, como bien se mencionó esta la Pasta Triple antibiótica que consiste en una combinación de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina utilizada como medicación intraconducto.⁹⁻²⁴ Durante la primera fase del procedimiento; diferentes estudios han manifestado las siguientes afectaciones:

Decoloración dental

- a) Minociclina: Asociada al uso de la minociclina (tetraciclina semisintética) que se relaciona con los iones calcio del diente a través de la quelación durante la desinfección del sistema radicular; este antibiótico de amplio espectro es uno de los componentes de la TAP, que ha producido efectos sobre el cambio de coloración de dientes deciduos y permanentes;²² afectando principalmente la estética de este último; donde diversos autores han propuesto cambiarlo por otro medicamento o simplemente descartar la minociclina para evitar efectos de decoloración dental.^{12,13,19,22,23}
- b) MTA gris: También se ha reportado la aplicación del MTA gris como uno de los factores de la decoloración dental producto del proceso de regeneración

endodóntica. A raíz de este problema eliminaron el aluminio ferrato tetracálcio que producía la decoloración a los dientes permanentes inmaduros a través de una purificación durante su proceso laboratorial;⁸³ surgiendo el MTA blanco que también ha sido implicada en el cambio de coloración de los dientes permanentes inmaduros durante la regeneración endodóntica.²⁴

- c) Pigmento sanguíneo: El depósito de pigmento sanguíneo en los túbulos dentinarios, debido a una incorrecta limpieza del acceso de la cavidad, permitiendo que los productos de degradación de la sangre ingresen a los túbulos dentinarios, dando como resultado la decoloración dental del diente.²⁴

Citotoxicidad

La aplicación de la TAP como medicación intraconducto en la regeneración endodóntica ha sido efectiva clínica y microbiológicamente frente a diferentes patógenos que abarcan ciertas patologías pulpares.^{3,5,6,14} Sin embargo, se ha reportado la posibilidad de resistencia bacteriana, debido a las altas concentraciones de forma empírica utilizadas clínicamente que produzcan citotoxicidad; como por ejemplo las concentraciones reportadas por Hoshino¹⁰ de 100 - 200 µg/ml y 25 µg/ml de TAP, que fueron capaces de erradicar todas las bacterias aisladas.¹⁶ A partir de ello, diversos estudios se han enfocado en la citotoxicidad que presenta la asociación de antibióticos frente a las diferentes células que son participes en el proceso de la regeneración endodóntica de los dientes permanentes inmaduros con ápice abierto, con la finalidad de evaluar los efectos que podrían ocasionar.⁹ Encontrar el equilibrio de las concentraciones de antibióticos que ejerzan una actividad integral sobre los patógenos endodónticos sin producir citotoxicidad sobre diferentes células madres

podría ser la clave para obtener resultados clínicos exitosos. Se han sugerido que diferentes combinaciones antibióticas de 1mg/ml de concentración han logrado erradicar patógenos endodónticos sin tener efecto citotóxico sobre células de la papila apical; así como concentraciones mucho más bajas de 0.39 µg/ml de TAP sobre las células madre de la pulpa.¹⁹ Asimismo otros estudios utilizando la TAP sobre células de la papila apical no tuvieron efectos citotóxicos a concentraciones de 0.01-0.10 mg/mL.⁸³ Sin embargo, estas pruebas *in vitro* se encuentran de forma líquida, lo que impide su uso clínico momentáneamente.²⁰ Por otro lado, se ha observado de forma individual la citotoxicidad de cada antibiótico; demostrando que el metronidazol por sí solo no produce tales efectos sobre las diferentes células madre.⁹

Otra de las razones de citotoxicidad de los antibióticos químicamente puros podría deberse a el bajo pH de TAP (pH = 4.0-4.6), debido a que el clorhidrato de minociclina y el clorhidrato de ciprofloxacino liberan iones de hidrogeno a partir del grupo HCl, dando como resultado una condición ácida que es desfavorable para el cultivo de células.⁸⁴ También se ha observado que el hipoclorito de sodio y la clorhexidina pueden reducir la unión de las células madre a la dentina; en el caso de NaOCl, estos efectos se han revertido con EDTA.⁹

Microdureza

Un reciente estudio *in vitro* informó una reducción en la microdureza y resistencia a la fractura de la raíz después de uno y tres meses de aplicación de la TAP, pasta dantibiótica e hidróxido de calcio como medicación intraconducto.⁸⁵ Como una alternativa a este problema se sugirió añadir metilcelulosa para minimizar la reducción

de microdureza de las raíces en comparación con la concentración actualmente utilizada de 1g/mL de la combinación de esos antibióticos.²³

Alternativas de la Pasta Triple Antibiótica (TAP)

El 80% de estudios que incluyen la pasta triple antibiótica (TAP) en la desinfección de conductos ha tenido éxito contra la mayoría de patógenos endodónticos difíciles de erradicar como el *E. faecalis*.^{15,18} Sin embargo, se ha evidenciado que la decoloración dental que produce la minociclina;^{12,22,24} ha conllevado a descartarlo y convertirlo en una pasta duantibiótica (DAP)^{15,18} o sustituirlo por antibióticos de amplio espectro como la amoxicilina, cefaclor.^{17,22} ó la clindamicina.^{19,23,24}

a) Pasta Duantibiotica (DAP)

Para resolver el problema de la decoloración dental producida por la presencia de la minociclina en la TAP; han propuesto únicamente la combinación de metronidazol con ciprofloxacino obteniendo excelentes resultados dentro del proceso de regeneración endodóntica utilizando concentraciones antibióticas apropiadas de 0,125 mg/ml de DAP y TAP, que lograron efectos antimicrobianos sobre el *E. faecalis* sin mostrar citotoxicidad sobre las células madre. Esto permite una base fundamental para el uso clínico en la desinfección del sistema de conductos sin dañar otras células y tejidos del diente.¹⁸

b) Amoxicilina

La amoxicilina que pertenece al grupo de penicilinas sintéticas es el antibiótico por excelencia en infecciones dentales, debido a que la mayoría de ellas ha sido resuelta con una concentración de 250mg o 500mg por vía oral.⁶⁷ Debido a su uso indiscriminado se ha observado resistencia de ciertos microorganismos frente a este

antibiótico; por esta razón se está sustituyendo por otros medicamentos que cumplan similar o mejor función sobre esta problemática. Una contraindicación de uso es las alergias reportadas por su uso en pacientes.⁸⁶ Por ello, su uso es limitado si se desea colocar como medicación intraconducto. Pese a presentar excelente eficacia antimicrobiana en combinación con el metronidazol y ciprofloxacino sobre el *E. faecalis*, quien es una de las bacterias anaerobias facultativas predominantes en infecciones endodónticas con concentraciones mínimas de 0,195µg/ml para inhibir su crecimiento y 6,25µg/ml para eliminarlo.²¹

c) Cefaclor

Pertenece al grupo de cefalosporinas de segunda generación, siendo más efectivo que los de primera generación sobre anaerobios de la cavidad oral.⁶⁷ Una alternativa a la decoloración dental que también ha sido reportada en el tratamiento de regeneración endodóntica con buenos resultados clínicos ha sido la incorporación del cefaclor en la TAP como medicación intraconducto.⁸⁷ Sin embargo, las concentraciones que requiere este antibiótico son de 0,195µg/ml para inhibir el crecimiento bacteriano del *E. faecalis* y una alta concentración de 25µg/ml para erradicarlo por completo.²¹

d) Clindamicina

La clindamicina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de lincosamidas que ha sido utilizada por más de 30 años en el área médica; así como satisfactoriamente en la consulta dental general aplicada para profilaxis de endocarditis bacteriana secundaria a intervenciones ortognaticas e infecciones dentales aguda. Debido a la naturaleza polimicrobiana de la mayoría de infecciones dentales que incluyen bacterias aerobias y anaerobias.⁸⁸

El mecanismo de acción de la clindamicina es la inhibición de la síntesis de proteínas, que actúa específicamente en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. La síntesis de proteínas se inhibe principalmente en la elongación temprana de la cadena por interferencia con la reacción de transpeptidación.⁶⁷ Además de influir en ciertas funciones bacterianas que reducen los factores de virulencia e incrementa la actividad bactericida del sistema inmune del paciente. Esto se traduce que la clindamicina refuerza la actividad bactericida transportándose de forma activa en los leucocitos polimorfos nucleares (PMN), donde alcanza una concentración intracelular elevada, facilitando la quimiotaxis e inhibiendo la formación de la capsula bacteriana mediante una acción prefangocítica sobre ellas. Asimismo, las concentraciones elevadas de clindamicina alcanzan los tejidos orales, la saliva, líquido intersticial gingival y hueso mandibular. Siendo este último el más afectado por lesiones periapicales que requieren tratamiento endodóntico.⁸⁸

Entre las concentraciones utilizadas para aislar cultivos bacterianos se han manifestado entre 1 a 2µg/ml que se aproxima a la concentración de clindamicina en el líquido intersticial gingival 6 horas después de su administración con una dosis de 300 µg.⁸⁸ Similares resultados se obtuvieron a partir de estudios comparativos entre la amoxicilina y la clindamicina ingeridas via oral; dando una concentración media de amoxicilina 0.502 µg/g en las raíces y 0.171 µg/g en las coronas y una concentración media de clindamicina de 0.270 µg/g en las raíces y 0.064 µg/g en las coronas; demostrando que una única dosis de ambos antibióticos exceden la concentración mínima inhibitoria de algunas bacterias de la cavidad oral, lo que podría conllevar a una toxicidad de otros tejidos circundantes.⁸⁹

Debido al predominio de especies anaeróbicas en las infecciones periapicales agudas, se pensó que la clindamicina sería un agente adyuvante apropiado en el tratamiento de estas infecciones.⁹⁰ Sin embargo, en un estudio de dientes con periodontitis apical el 69% de las cepas bacterianas recuperadas de los conductos radiculares fueron anaerobios.^{38,39} Los enterococos se aislaron en el 50% de los casos infecciosos resultando los más frecuentes. Un estudio posterior sobre la susceptibilidad de los enterococos aislados de los conductos radiculares a diversos antibióticos encontró que 25 de 29 cepas eran resistentes a la clindamicina.⁹¹ Estos resultados son similares a los de un estudio anterior en el que se encontró que los enterococos aislados eran total o parcialmente resistentes a la clindamicina. Este lincosamida también se ha investigado como un medicamento local por Mollander. Cuando se aplicó como una pasta intraconducto a base de clindamicina disuelta en solución salina, se encontró que no confería ninguna ventaja sobre los apósitos convencionales de conductos radiculares.³⁹ Sin embargo, la incorporación de la clindamicina en la Pasta Triple Antibiótica como reemplazo de la minociclina, ha conseguido excelentes resultados como los reportados por McTigue y Burrus; quienes aplicaron esta nueva pasta modificada en una serie de casos clínicos que presentaron patologías pulpares con una microflora bacteriana.^{13,24} Del mismo modo, también se han realizado estudios relacionados con la microdureza utilizando esta nueva asociación antibiótica, ofreciendo óptimos resultados sobre la dentina radicular durante el proceso de regeneración endodóntica.²³ Finalmente los estudios antimicrobianos también fueron evaluados, encontrando que geles cargados con un 1mg/ml de la Pasta Triple Antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) ofrece un significativo efecto sobre el

biofilm de *E. faecalis*, que últimamente sigue siendo principal motivo de investigación, debido a su complicada erradicación.¹⁹

Alternativas del Mineral Trióxido Agregado (MTA)

Biodentine

Es un cemento a base de silicato de calcio, del mismo tipo que el MTA; tanto sus propiedades físicas como químicas son similares a la descritas por el cemento Portland. La biocompatibilidad que ha sido estudiada rigurosamente por Lauren, quien concretó que el Biodentine™ puede ser un sustituto de la dentina bioactivo para la reparación de perforaciones radiculares, apexificación y sellado radicular retrogrado, siendo menos citotóxica que otros materiales que se utilizan actualmente en la terapia pulpar.⁹² Su composición de polvo modificado, como la adición de aceleradores y ablandadores de fraguado y una nueva formulación de cápsula predosificada mejoraron en gran medida las propiedades físicas de este material, haciéndolo mucho más fácil de usar con un tiempo de fraguado más corto que lo logrado por el MTA.⁹³ About *et al.* investigaron la bioactividad del Biodentine™ mediante el estudio de sus efectos sobre la activación, diferenciación y regeneración de la dentina con el uso de las células madre de la pulpa dental. El estudio concluyó que Biodentine™ estimula la regeneración de dentina al inducir la diferenciación de odontoblastos de las células madre de la pulpa.⁹⁴ Laurent *et al.* investigaron la capacidad de Biodentine™ para evaluar la secreción del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) de células de la pulpa; concluyendo que el Biodentin proporcionó un aumento significativo de la secreción de TGF- $\beta 1$ de las células pulpares, induciendo una forma temprana de mineralización de pulpa dental poco después su aplicación.⁹¹ Han y Okiji compararon

la absorción de calcio y silicio por la dentina del conducto radicularadyacente en presencia de solución salina tamponada con fosfato utilizando Biodentine™ y ProRoot® MTA. Sus resultados mostraron que ambos materiales formaban una estructura parecida a una etiqueta compuesta del propio material o depósitos cristalinos ricos en calcio o fosfato. El grosor de las capas ricas en Ca y Si aumentaron con el tiempo y el grosor de la capa rica en Ca y Si fue significativamente mayor en el Biodentine™ en comparación con el MTA después de 30 y 90 días, concluyendo que la absorción del elemento de dentina fue mayor para Biodentine™ que para MTA.⁹⁵

2.3. Terminología básica

1. Acción antimicrobiana: Es la acción de un agente que logre detener o erradicar definitivamente la actividad celular sobre cierto tipo de microorganismos.

2. Concentración mínima inhibitoria: Es la mínima concentración de un antimicrobiano que actúa como elemento bacteriostático sobre microorganismos.

3. Concentración mínima bactericida: Es la mínima concentración de un antimicrobiano que elimina en un 99% la supervivencia de microorganismos.

4. LSTR: Propuesta por el Dr. Hoshino para el uso de la pasta triple antibiótica mediante sus siglas en inglés que representan la esterilización de la lesión y reparación de tejidos afectados por patologías pulpares.

5. NIET: Es la técnica endodóntica que requiere el uso de la pasta triple antibiótica, con sus siglas en inglés referidas al tratamiento endodóntico no instrumentado.

6. Revascularización: Es un tratamiento regenerativo con enfoque biológico, para tratar dientes permanentes jóvenes con pulpa necrótica por caries dental o trauma mediante la supervivencia de células madres que son capaces de diferenciarse en odontoblastos secundarios y conformar el tejido radicular.

7. TAP: Siglas en inglés que representa a la pasta triple antibiótica compuesta por antibióticos como la minociclina, metronidazol y ciprofloxacino.

8. MTAP: Siglas en inglés que representa a la pasta triple antibiótica modificada, compuesta por antibióticos como la clindamicina, metronidazol y ciprofloxacino.

9. Regeneración endodóntica: Es la denominación universal actual efectuada por la Asociación Americana de Endodoncia referida al proceso de revascularización o revitalización utilizada anteriormente; con un previo suceso de la desinfección de los conductos mediante la terapia LSTR y el NIET.

2.4. Hipótesis

La pasta triple antibiótica modificada con clindamicina presenta mejor acción antimicrobiana que la pasta triple antibiótica a diferentes concentraciones sobre la cepa de *enterococcus faecalis*.

2.5 Variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
TAP (minociclina, ciprofloxacino y metronidazol)	Variable Independiente	Combinación de antibióticos químicamente puros diluidos a diferentes concentraciones		Concentración en µg/ml	Ordinal	0,125 µg/ml 0,25 µg/ml 0,5 µg/ml 1 µg/ml 2 µg/ml
MTAP (clindamicina, ciprofloxacino y metronidazol)	Variable Independiente	Combinación de antibióticos químicamente puros diluidos a diferentes concentraciones		Concentración en µg/ml	Ordinal	0,125 µg/ml 0,25 µg/ml 0,5 µg/ml 1 µg/ml 2 µg/ml
Acción sobre <i>enterococcus faecalis</i>	Variable dependiente	Es el efecto de los antibióticos diluidos a diferentes concentraciones que inhiban o eliminen la cepa de E. faecalis	Concentración mínima inhibitoria (MIC)	0,125 µg/ml	Nominal	Si No
				0,25 µg/ml		Si No
				0,5 µg/ml		Si No
				1 µg/ml		Si No
				2 µg/ml		Si No
			Concentración mínima bactericida (MBC)			

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación

- Descriptivo
- Prospectivo
- Transversal
- *In vitro*

Ámbito de la investigación

El estudio fue realizado dentro de las instalaciones del Laboratorio de Anaerobios en el Instituto de Ciencias Biológicas ICB de la Universidad de São Paulo – Brasil.

3.2. Población y muestra

3.3.1 Población

Bacterias anaerobias facultativas grampositivas

3.3.2 Muestra

- Cepa identificada como: *enterococcus faecalis* ATCC® 29212
- Diferentes concentraciones que componen la TAP 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml
- Diferentes concentraciones que componen la MTAP 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0,125 µg/ml

3.3.3 Criterios de Inclusión

Pertencientes al grupo de bacterias anaerobias facultativas persistentes al tratamiento de conducto en dientes permanentes.

3.3.4 Criterios de exclusión

Pertencientes al grupo de bacterias aerobias

Pertencientes al grupo de bacterias anaerobias estrictas

Pertencientes al grupo de espiroquetas y hongos

3.3.5 Tamaño de muestra y Tipo de muestreo:

- Microorganismos anaerobios facultativos.
- Muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se obtuvo la aceptación del estudio otorgado por la Escuela Académica de Odontología y la aprobación del Comité de ética de la Universidad Privada Norbert Wiener para proceder con el proyecto de investigación. Asimismo, se aprobaron los permisos correspondientes para el uso de las instalaciones del laboratorio de Anaerobios de la Universidad de São Paulo – Brasil, donde se ejecutó el estudio experimental que fue dividido en la siguiente manera:

Grupos experimentales

Las drogas químicamente puras o también denominadas *Stándar* de ambos grupos experimentales estuvieron compuestos por:

- Pasta Triple Antibiótica “**TAP**”: Minociclina, Metronidazol y Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO)
- Pasta Triple Antibiótica Modificada “**MTAP**”: Clindamicina, Metronidazol y Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO)

Elaboración de las soluciones antibióticas

A partir de la presentación stock en polvo de 1mg/ml de cada droga se prepararon soluciones mezcladas con agua estéril y alcohol de 92.8° utilizados como solventes. Para ello, utilizamos una balanza electrónica de precisión (Marte®, 0.001g, Brasil) y cinco tubos erlenmeyer donde se mezclaron con los solventes a través de un agitador Shaker tipo Vórtex (Benchmark®, 200-3200 rpm, USA) y posteriormente se forraron con papel de aluminio y almacenaron hasta su uso. Obteniendo finalmente soluciones de: (0,01g/10ml)

- 0,01g de minociclina y 10ml de agua estéril
- 0,01g de clindamicina y 10ml de agua estéril
- 0,01g de ciprofloxacino y 10ml de agua estéril
- 0,01g de Metronidazol y 9ml de agua estéril con 1ml alcohol.

Preparación de los grupos experimentales

Para obtener las concentraciones finales de 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml que fueron utilizadas en cada grupo.¹⁸ Se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

- C_i = Concentración inicial
- V_i = Volumen inicial
- C_f = Concentración final
- V_f = Volumen final

Con la finalidad de conocer el volumen inicial que se requiere para obtener las concentraciones finales anteriormente mencionadas colocadas en una serie de tubos de ensayo.

Dando como resultado final:

- Solución de TAP = compuesta por las soluciones de minociclina, metronidazol y ciprofloxacino en concentraciones de 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml.

- Solución de MTAP = compuesta por las soluciones de clindamicina, metronidazol y ciprofloxacino en concentraciones de 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml.

Procesamiento del material biológico

La cepa que se utilizó para el presente estudio fue identificada como *enterococcus faecalis* ATCC® (American Type Culture Collection) 29212.

Reactivación de cepas

Desde el momento de su adquisición hasta su uso en las instalaciones del Laboratorio de Anaerobios del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de São Paulo – Brasil, las cepas fueron almacenadas dentro de su envase Kwik - Stick™ entre 2° a 8°C según las indicaciones del laboratorio.

Al momento de su uso se procedió a ser sembrado en caldo de infusión cerebro corazón por un lapso de 24 h para su crecimiento en anaerobiosis, que requirió de un motor Megavac Vacuum Pump (Cenco®, 0.125 HP, USA), con dos exposiciones de nitrógeno comprimido (Gama Gases®, UN 1066 nitrógeno comprimido, 2.2, Brasil) y una de mixtura de gases (Gama Gases®, UN 1956- 90% nitrógeno+10% CO₂, Brasil). Al finalizar el proceso de reactivación de la cepa de *enterococcus faecalis* se dio paso a un procedimiento confirmatorio básico como es la Tinción Gram para la identificación y confirmación de la cepa de estudio.

Inóculo bacteriano

Mediante el método de dilución en caldo ⁵⁹ y posterior al proceso confirmatorio de la cepa de *enterococcus faecalis* se continuó con la inoculación de este microorganismo utilizando un ansa estéril que fue incorporado en una serie de 10 tubos de ensayo con 5 ml de infusión cerebro-corazón (BHI) enriquecido con extracto de levadura, que fue dividido en 5 tubos para el grupo experimental TAP y MTAP. De la misma forma se obtuvo dos grupos control que fueron divididos en cada muestra; conteniendo únicamente 5ml de BHI y 100µL de *E. faecalis* equivalente a 10⁶ UFC/ml que fueron incubadas a 37° C por 24 horas para su crecimiento.

Comprobación del crecimiento bacteriano

Ambos grupos experimentales con sus respectivos controles concentraron finalmente 5ml de BHI ajustados en una dilución de 0,5 según la escala turbimétrica de Mc Farland; equivalente a 10⁸UFC/ml de *enterococcus faecalis* pasado el tiempo determinado.

Obteniendo concentraciones finales de 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml en:

- Grupo A: Pasta Triple Antibiótica “**TAP**”
Contiene Minociclina, Metronidazol y Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) + 100µL de *E. faecalis* + 5ml de BHI
- Grupo B: Pasta Triple Antibiótica Modificada “**MTAP**”
Contiene Clindamicina, Metronidazol y Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) + 100µL de *E. faecalis* + 5ml de BHI

- Grupo control: Un tubo control para cada grupo experimental con 100µL de *E. faecalis* + 5ml de BHI

Prueba de sensibilidad

La prueba de sensibilidad bacteriana del *E. faecalis* frente a la TAP y MTAP fueron identificados a través de la técnica de Macrodilución con la finalidad de obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). Mediante indicadores como: turbidez, película o sedimento en comparación con el Grupo control se identificaron la concentración mínima inhibitoria. Mientras que la MBC fue obtenido a partir del subcultivo de los tubos sin crecimiento bacteriano visible de la MIC, que nos permitió evaluar la eliminación en un 99.9% del *E. faecalis*.⁵⁹ Para ello se necesitaron 25 µL de cada MIC, que fueron colocados directamente sobre placas con agar sangre y almacenadas en condiciones de anaerobiosis para su posterior lectura a las 24 horas.

Manejo de residuos biológicos

Posterior a la culminación del trabajo experimental de cada muestra se desinfectó la zona de trabajo con lejía al 5% sobre papel absorbente,⁹⁵ utilizando el equipo de bioseguridad personal.

Las placas de cultivo con materiales biológicos fueron trasladadas a un contenedor primario; es decir en una bolsa negra con un contenido de hasta $\frac{3}{4}$ que fue anudada y cubierta por una bolsa color amarillo con las indicaciones correspondientes de ser un residuo especial, almacenado en un contenedor amarillo rotulado con las mismas indicaciones que la bolsa amarilla.⁹⁵ Finalmente el material es transportado por el

personal autorizado hasta la incineración de los residuos biológicos; mientras que el resto de instrumentos utilizados fueron esterilizados en un autoclave (Fabbe-Primar®, 70L, Brasil).

3.4 Procesamiento y análisis de datos

Los datos fueron analizados y comparados mediante gráficos y tablas de los grupos TAP y MTAP. Por otro lado, la complejidad de la metodología limitó a describir la repercusión de los antibióticos sobre la cepa *E. faecalis*; a través de indicadores. Asimismo no permitió realizar cálculos estadísticos; puesto que el estudio se realizó dos veces obteniendo un tamaño de muestra 2; logrando un trabajo de índole descriptiva.

3.5 Aspectos éticos

La presente investigación se ejecutó según las normas internacionales y nacionales sobre investigación en humanos, animales o microorganismos. Bajo los protocolos de bioseguridad. Se siguió el procedimiento metodológico que mejor se adapte a las circunstancias del estudio, así como el uso de un instrumento de recolección de datos de confiabilidad suficiente para lograr los objetivos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Según los indicadores planteados en el presente estudio existieron cambios significativos de turbidez en las concentraciones 2 µg/ml y 1 µg/ml para el grupo TAP; siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) 1 µg/ml. De ambas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano no se evidenciaron zonas de inhibición que permitan evaluar su efecto bactericida (MBC) sobre las cepas ATCC® 29212 de *E. faecalis*. Demostrando que la TAP no presenta un efecto bactericida en relación a la concentraciones establecidas por este estudio.

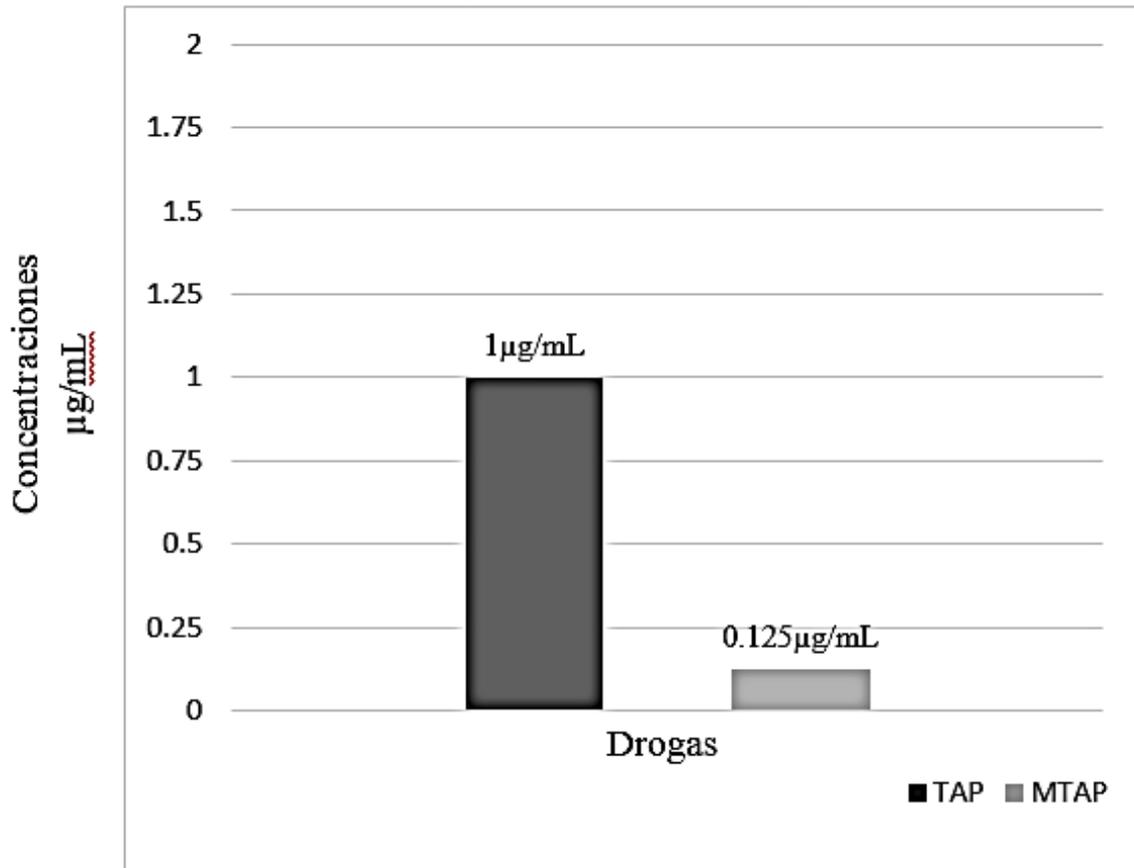
El grupo de la MTAP obtuvo un cambio significativo superior que la TAP en relación a su turbidez para todas las concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml; con excepción del grupo control que no mostró cambios significativos. La MIC fue 0.125 µg/ml, logrando obtener la concentración más baja de ambos grupos, que permitió erradicar las cepas ATCC® 29212 de *E. faecalis*. Asimismo, se determinó que las concentraciones de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml respectivamente; obtuvieron un efecto bactericida, eliminando en un 99.9% las cepas de *E. faecalis*. Siendo la concentración mínima bactericida (MBC) 0.5 µg/ml.

TABLA N°5 Identificación de la/las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de la TAP y MTAP sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentraciones en $\mu\text{g/ml}$	Muestra experimental TAP		Muestra experimental MTAP	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
Control	-	-	-	-
0.125 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%
0.25 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%
0.5 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%
1 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%	100%
2 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%	100%

La tabla muestra las concentraciones mínimas inhibitorias del grupo TAP y MTAP. Donde 1 $\mu\text{g/ml}$ de TAP es la mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de las cepas de ATCC de *E. faecalis* seguido de la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$; mientras el grupo MTAP requiere una mínima concentración de 0.125 $\mu\text{g/ml}$, la cual es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de las cepas ATCC de *E. faecalis* seguido de las concentraciones de 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$.

GRÁFICO N°:12 Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los grupos TAP y MTAP a diferentes concentraciones expresadas en $\mu\text{g/ml}$



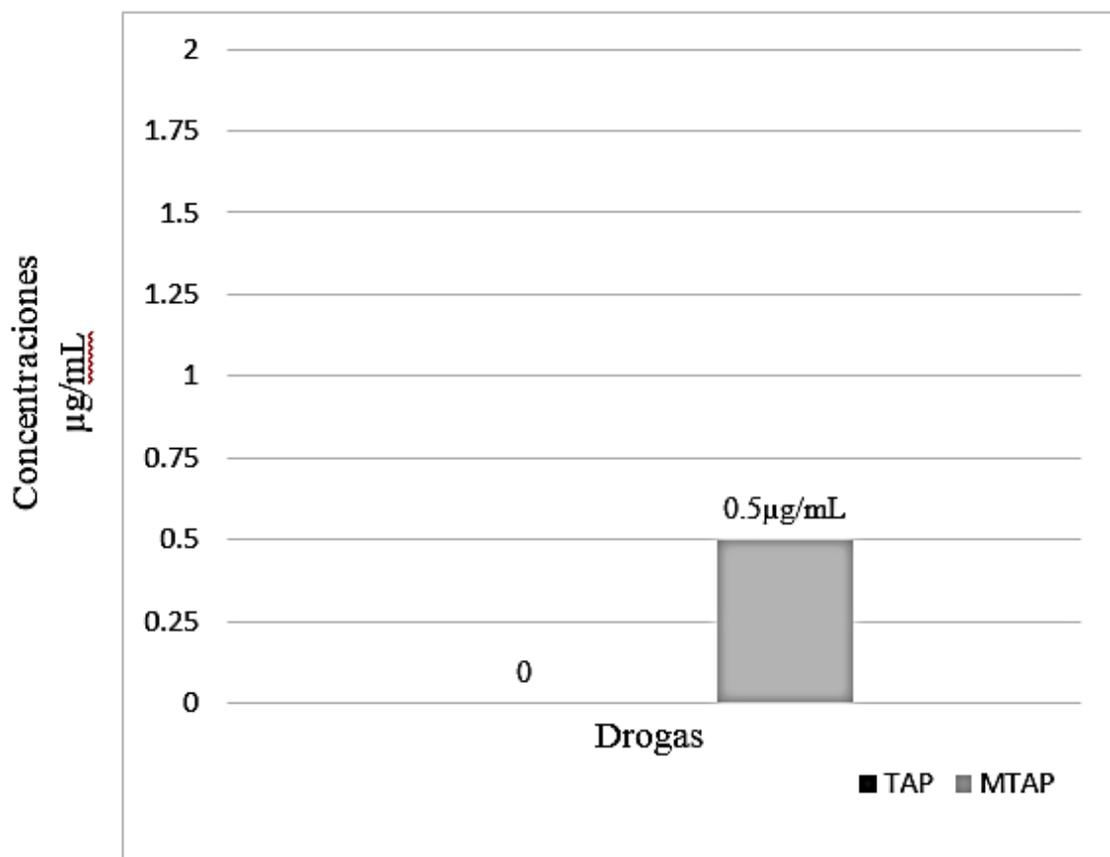
El gráfico muestra la comparación de ambas concentraciones mínimas inhibitorias de los grupos TAP y MTAP. Donde el grupo MTAP muestra una baja concentración de 0.125 $\mu\text{g/ml}$. A diferencia del grupo TAP, que requiere de 1 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el crecimiento bacteriano de las cepas de *E. faecalis*.

TABLA N°6 Identificación de la/las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) de la TAP y MTAP sobre la cepa de *enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentraciones en $\mu\text{g/ml}$	Muestra experimental TAP		Muestra experimental MTAP	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
Control	-	-	-	-
0.125 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
0.25 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
0.5 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%
1 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%
2 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100%	100%

La tabla muestra las concentraciones mínimas bactericidas del grupo TAP y MTAP. Donde el grupo TAP no presenta una concentración mínima bactericida de las concentraciones planteadas en este estudio sobre las cepas de ATCC de *E. faecalis*. Por otro lado, el grupo MTAP identificó una mínima concentración bactericida de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, la cual es capaz de eliminar las cepas ATCC de *E. faecalis* seguido de las concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$.

GRÁFICO N°:13 Comparación de la concentración mínima bactericida de los grupos TAP y MTAP a diferentes concentraciones expresadas en $\mu\text{g/ml}$



El gráfico muestra la comparación de ambas concentraciones mínimas bactericidas de los grupos TAP y MTAP. Donde el grupo MTAP muestra una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ para erradicar al 99.9% las cepas de *E. faecalis*. A diferencia del grupo TAP, que no muestra un efecto bactericida en ninguna de las concentraciones establecidas por esta investigación.

TABLA N°7: Comparación de la acción antimicrobiana de los grupos de la pasta triple antibiótica (TAP) y la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) mediante la MIC y MBC

Bacteria	CMI μg/mL		CMB μg/mL	
	TAP	MTAP	TAP	MTAP
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0.125	--	0.5

Ambos grupos de TAP y MTAP inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas de *E. faecalis*. Sin embargo, fue la MTAP, quien mostró en este estudio una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.125 μg/ml en comparación del *Gold Stándar*, que es la TAP, obteniendo una MIC de 1 μg/ml. Mientras que solo la MTAP mostró una concentración mínima bactericida (MBC) de 0.5 μg/ml en comparación con la TAP, que no mostró una MBC en ninguna de las concentraciones propuestas en esta investigación.

4.2. Discusión

Este estudio ha demostrado que la asociación de antibióticos que componen la TAP y MTAP tienen efectos antimicrobianos sobre la cepa de *E. faecalis*; quien ha sido materia de estudios para evaluar su eliminación, ^{7,15,18-21} puesto que desempeñan un rol importante en infecciones persistentes.⁵⁶ La TAP requirió una mínima concentración de 1 µg/mL para inhibir el crecimiento del *E. faecalis*. Similar resultado obtenido por Reyhani, que evaluó diferentes concentraciones de TAP, resultando que ha concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 mg/mL de TAP existe una significativa reducción de UFC comparadas con sus grupos control.²⁰ Mientras que Alyas define en un estudio *in vitro* que una dentina pretratada con TAP necesita de 10 mg/mL para obtener efectos bacterianos residuales, que podrían ser utilizados durante el proceso de desinfección de la regeneración endodóntica.¹⁶ Siendo esta ultima concentración muy alta, pudiendo causar efectos citotóxicos sobre las células encontradas en un diente permanente inmaduro.^{9,18}

Por tal razón, el presente estudio utilizó una nueva alternativa propuesta en una serie de casos clínicos denominada MTAP; que obtuvo una baja concentración de 0,125 µg/ml, resultando por debajo de las concentraciones encontradas por otros autores. Pudiendo ser menos lesivo que los irrigantes como el NaOCl, que a bajas concentraciones no ha logrado erradicar el *E. faecalis* por completo; a diferencia de las altas concentraciones que suelen ser tóxicas sobre ciertas células y tejidos del diente. Inclusive han reportado que una concentración por debajo de 0,1% de NaOCl puede ser caustico.⁶³ En base a ello, países como EEUU han tomado la decisión de diluir concentraciones de 5,25% de NaOCl a 2.5%, porque consideran que el

porcentaje y grado de disolución se encuentra en función de la concentración del irrigante. Mientras otros autores recomiendan una baja concentración de NaOCl de 0.5% al 1% para tratar pulpas vitales²⁹ y del 1% al 5% para dientes necróticos.⁶⁴ Situación que difiere con nuestro estudio, el cual solo requirió una concentración de 0,125 µg/ml de MTAP y 1 µg/ml de TAP logrando erradicar una cepa persistente como el *E. faecalis*. Similar suceso ocurre con el uso de la clorhexidina que en concentraciones de 2% tiene la capacidad de disolver tejidos orgánicos;^{63,64} Sin embargo, se ha demostrado que su aplicación del 1% de CXH resulta altamente irritativo; por lo que sugieren su uso a bajas concentraciones de 0,12% que no tiene acción antimicrobiana sobre ciertos patógenos endodónticos que tienen la particularidad de formar biofilms y hacerse persistentes en una infección.⁶⁴ Por lo anteriormente detallado, actualmente no se establece una concentración estándar para el uso clínico, debido a esta gran controversia. Esto ha traído como consecuencia generalizar la toxicidad debido a las altas concentraciones de diferentes antimicrobianos que pueden ser letal para un diente permanente inmaduro en formación.

Una opción a ello, es la fitoterapia que ha obtenido importancia en algunas literaturas por ser mínimamente tóxico y altamente antimicrobiano como la curcumina fotoactivada que utilizó Devaraj en comparación con 1mg de TAP, CXH y Ca(OH)₂ mediante un estudio *in vitro* sobre biofilms de *E. faecalis*,¹⁵ estudio que contrasta con esta investigación en relación a la acción antimicrobiana que ejerció las bajas concentraciones de TAP y MTAP; obteniendo esta última una MIC de 0.125 µg/ml y una MBC de 0.5 µg/ml; llegando inclusive a ser menor que los resultados encontrados

por Bravo, donde identificó que la TAP modificada con amoxicilina obtuvo una MIC de 0,195µg/ml y una MBC de 6,25µg/ml sobre las cepas de *E. faecalis*; siendo aún concentraciones altas comparadas con esta pesquisa.²¹

El hidróxido de calcio ha sido el material de elección para el tratamiento de apexificación en dientes permanentes inmaduros,^{78,79} no obstante, se han reportado algunos cambios en las propiedades químicas y mecánicas de la dentina radicular que han originado un baja microdureza, resultando una raíz más propensa a fracturas radiculares de dientes que estuvieron bajo el tratamiento de apexificación,⁸⁵ es por ello, esta investigación contrasta con las recomendaciones de Prather en relación del uso de 1g/mL de TAP ó MTAP como sustitución al Ca(OH)₂.²³

El 80% de investigaciones reportadas bajo el protocolo de regeneración endodóntica han incluido dentro de su proceso de desinfección el uso de la TAP, ^{3-6,10,11,14-17,19-21,24} que hasta la actualidad viene siendo ejecutada prioritariamente en el área odontopediátrica con el uso de otras medicaciones intraconducto como la pasta CTZ^{71,72} y la pasta Guedes-Pinto;^{71,73} con reportes de caso clínico controlados aproximadamente doce meses. Sin embargo, no es suficiente en relación a los casos clínicos randomizados presentados por Hoshino y Sato, que obtuvieron controles de hasta 2,390 días postratamiento con la TAP,^{8,65} seguido de Takushige con un control no mayor a 2,065 días; lo que considera a la TAP o también denominada 3Mix-MP como una de las más utilizadas con largos periodos de control clínico.⁶⁵ A diferencia de este estudio *in vitro* que propone una nueva modificación de uno de sus componentes de la TAP; en base a estos resultados permita estudios mas profundos hasta ser aplicado en pacientes mediante estudios clínicos randomizados.

Un problema principal y fuente de estudios *in vitro* actualmente es la citotoxicidad que produce la TAP sobre las células madre que son elementos dentro del proceso de ingeniería tisular, que ha sido analizada en investigaciones con la finalidad de hallar la mínima concentración de TAP que no produzca citotoxicidad sobre ellas.^{9,18,83} Los resultados encontrados por Chuensombat demostraron que una concentración de 0,39 µg/ml de solución de TAP es la ideal para no producir toxicidad sobre células de la pulpa dental (DPSCs) y papila apical (SCAPs) que son elementos importantes dentro del proceso de regeneración endodóntica;⁹ estos resultados se encuentran próximos a los obtenidos en esta investigación, dado que se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.125 µg/ml utilizando la MTAP; que nos da a proponer la hipótesis que tal concentración incluso podría ser menos citotóxica debido a que es más baja que lo hallado por Chuensombat. Para ello, se necesitarían de estudios moleculares de esta nueva asociación antibiótica de MTAP, que hasta el momento ofrece resultados *in vitro* con información limitada.

Por otro lado, Schüssl⁸⁹ ha identificado que una dosis vía oral de clindamicina deja una concentración de 0.270 µg/g en las raíces; demostrando que una única dosis excede la MIC propuesta por el CLSI,⁵⁸ sobre algunas bacterias de la cavidad oral, que podría conllevar a una toxicidad. Asimismo, se han estudiado por separado cada componente de la TAP; demostrando que el metronidazol por sí solo no tiene efectos citotóxicos sobre las células DPSCs y SCAPs, pero es ineficaz contra bacterias aerobias y anaerobias; por eso recomiendan combinarlo con una penicilina, cefalosporina o macrólido.⁹ Como este estudio que también demostró efectividad de la asociación de antibióticos de los grupos TAP o MTAP. Respaldado por Molander, quien concluyó que

para esterilizar tales lesiones, un solo medicamento antibacteriano no es efectivo; como es el caso de la clindamicina que en un estudio microbiológico demostró no ser efectivo en conductos radiculares con periodontitis apical.³⁹ El éxito de este estudio podría deberse al sinergismo que existe entre los antibióticos que componen la TAP y MTAP que dan resultados más efectivos.

En otro contexto, Sabrah demostró que una concentración de 0.125mg/ml de TAP no fue tóxica sobre DPSCs.¹⁸ Las posibles razones se deberían al uso de antibióticos en el experimento y las diferentes técnicas para la preparación de la solución de TAP. Como por ejemplo esta investigación y la ejecutada por Chuensombat utilizaron métodos de dilución con drogas de diferentes laboratorios que fueron químicamente puras; bajo los criterios que proponen la farmacopea;⁶⁶ ya que posee mayor valor clínico y exactitud, comúnmente utilizado para evaluar la MIC de estos fármacos *Stándar* sobre bacterias anaerobias como el *E. faecalis*, y posteriormente ser sometido a una prueba de difusión en agar para identificar la CBM; a diferencia del método de difusión con discos que es menos costosa y sencilla para la práctica clínica;⁶² mientras que Sabrah ejecutó los trabajos experimentales con fármacos comerciales.¹⁸

Es importante conocer la condición ácida de algunos fármacos que podrían ejercer citotoxicidad.⁸⁴ Por ello, se deben seleccionarse antibióticos que tengan un pH neutro como un sustituto de la minociclina y el ciprofloxacino, ya que está demostrado que el metronidazol no ejerce citotoxicidad. Sin embargo, esos antibióticos alternativos deberían ofrecer una potente efectividad antibacteriana. Como los presentados en este estudio que identificó a la clindamicina como un excelente sustituto de la minociclina; demostrando que la MTAP es significativamente superior con una MIC de 0,125 µg/ml

y CBM de 0,5 µg/ml erradicando en un 99.9% las cepas de *E. faecalis*, comparado con lo hallado con el *Gold estándar* que es la TAP, que utiliza 1 mg/mL clínicamente de forma empírica.¹⁹

Otro de los problemas asociados con el uso de la TAP es la decoloración dental producida por uno de sus componentes que es la minociclina.¹² La TAP debido a su gran efectividad antimicrobiana fue propuesta como medicamento intraconducto durante el proceso de regeneración endodóntica en dientes inmaduros permanentes; donde fue observado a través de diversos casos clínicos la decoloración dental que estaría relacionada con el uso de la minociclina;^{3,5,6,14} sin embargo este no sería el único factor, puesto que algunos reportes clínicos han concluido que el MTA gris también tendría participación, al igual que la pigmentación sanguínea depositada en los túbulos dentinarios como consecuencia de una incorrecta limpieza del acceso de la cavidad.^{12,24} Por tal motivo, es que autores como Burrus¹³ y McTigue²⁴ reemplazaron el uso de la minociclina por la clindamicina (MTAP), obteniendo excelentes resultados clínicos dentro de sus reportes y controles de 12 meses aproximadamente. Mientras que Akcay optó por descartar el uso de la minociclina y convertirlo en una pasta duantibiótica (DAP), que ha demostrado ser una alternativa para evitar la decoloración dental y toxicidad sobre DPSCs, en comparación con otros antibióticos de amplio espectro como la amoxicilina, cefaclor y doxiciclina que no obtuvieron éxito en comparación con la DAP y el hidróxido de calcio.²² Por esta razón, se evaluó la MTAP desde el ámbito microbiológico con la finalidad de proponerlo como una alternativa de medicación intraconducto en procesos de regeneración endodóntica en dientes permanentes inmaduros y en terapias de dientes primarios gracias a su efectividad.

CAPITULO V

CONCUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se determinó que existe acción antimicrobiana de ambas combinaciones medicamentosas sobre cepas ATCC de *E. faecalis*.

Se identificó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la TAP fue de 1 µg/ml y la MTAP obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0,125 µg/ml,

Se identificó únicamente la Concentración Mínima Bactericida del grupo MTAP; obteniendo 0,5 µg/ml. Logrando que a bajas concentraciones erradique las cepas de *E. faecalis*. Mientras que el grupo TAP no demostró una MBC en ninguna de las concentraciones establecidas por esta pesquisa, sugiriendo que su acción bactericida

podría hallarse en concentraciones mayores a 2 µg/ml que no fueron estudiadas en esta investigación.

La TAP obtuvo una MIC y MBC mucho mayor que la hallada con la MTAP. Sin embargo en relación a la acción antimicrobiana ambos fueron eficaces sobre las cepas de *E. faecalis*.

En base a los resultados, debería considerarse la asociación de antibióticos compuesta por la MTAP como una alternativa dentro de la desinfección del sistema de conductos en el proceso de regeneración endodóntica y en terapias pulpares de dientes primarios, ya que ha demostrado mejor acción antimicrobiana que la TAP; utilizando mínimas concentraciones que logran erradicar las cepas de *E. faecalis*.

5.2. Recomendaciones

El siguiente paso para fundamentar la acción antimicrobiana de esta nueva alternativa MTAP es realizar estudios *in vitro* que comparen el uso de TAP y MTAP sobre biofilms maduros de *E. faecalis*, utilizando pruebas moleculares como el microscopio Láser confocal de barrido, PCR y LIVE-DEAD para un resultado completo. Asimismo, analizarlo sobre otros patógenos endodónticos frecuentes en dientes permanentes inmaduros con necrosis pulpar y lesiones periapicales.

Realizar estudios *ex vivo* con la MTAP. Asimismo, encontrar un método de utilizar estas concentraciones mínimas como medicación intraconducto, debido a que no se puede colocar de forma líquida dentro del conducto radicular.

Realizar estudios de citotoxicidad de la MTAP que corroboren las concentraciones mínimas halladas en esta pesquisa, con la finalidad de ser utilizado como una medicación intraconducto dentro del proceso de regeneración endodóntica. Asimismo, proponer estudios físico-químicos de esta alternativa de la minociclina. Debido a que la información del uso de la MTAP actualmente es limitada y no puede compararse con los estudios clínicos randomizados que ofrece la TAP.

Finalmente, tener presente que cualquier medicación intraconducto puede ser efectiva. Sin embargo, no es "ideal" sí afecta las células o tejidos sanos del diente, debido a sus altas concentraciones que pueden ser tóxicas para un diente en formación.

REFERENCIAS

1. Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D. Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics*. 2012; 22(1): 33-49.
2. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. *Pediatric Dentistry*. 2015; 37(6): 244-252.
3. Obando M, Muralles J, Silva-Herzog D, Cerda B, de Jesús-Pozos A. Medicación intraconducto utilizada para revascularización de dientes necróticos y formación radicular incompleta. *Rev ADM*. 2015; 72(3): 124-28.
4. Méndez V, Madrid K, Amador E, Silva-Herzog D, Oliva R. Revascularización en dientes permanentes con ápice inmaduro y necrosis pulpar: Revisión bibliográfica. *Rev ADM*. 2014; 71(3): 110-14.
5. Schmoeckel J, Mourad M, Splieth C, Santamaria R. Management of an immature, partially necrotic permanent molar by pulp revascularization: Two-year follow-up. *Quintessence Int*. 2017; 48(4): 309-13.
6. Khandewale S, Khalikar S, Agrawal T, Mahajan H. Revascularization of a permanent molar with open apex - A Case Report. *JIDA: J Indian Dent Assoc*. 2017; 11(2): 35-8.
7. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *J Endod*. 2012;38(10):1376-9.
8. Takushige T, Cruz E, Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J*. 2004; 37(2): 132-38.

9. Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. J Endod. 2013;39(6):813-9.
10. Hoshino E, Ando N, Sato I et al. In vitro antimicrobial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline. Int Endod J. 1996; 29(2):125-30.
11. Sato I, Kurihara-Ando N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline in situ. Int Endod J. 1996; 29(2):118-24.
12. Kahler B, Rossi-Fedele G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. J Endod. 2016;42(4):563-9.
13. Burrus D, Barbeau L, Hodgson B. Treatment of Abscessed Primary Molars Utilizing Lesion Sterilization and Tissue Repair: Literature Review and Report of Three Cases. Pediatric Dentistry. 2014; 36(3): 240-44.
14. López C, Mendoza A, Solano B, Yáñez-Vico R. Revascularization in Immature Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Apical Pathology: Case Series. Case Reports In Dentistry. 2017: 1-8.
15. Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantana P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *enterococcus faecalis in vitro*. Sci Rep. 2016; 6: 24797.
16. Alyas S, Fischer B, Ehrlich Y, Spolnik K, Gregory R, Yassen G. Direct and indirect antibacterial effects of various concentrations of triple antibiotic pastes loaded in a methylcellulose system. J Oral Sci. 2016; 58(4): 575-82.

17. Kangarlou A, Neshandar R, Matini N, Dianat O. Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2016; 10(4): 220-25.
18. Sabrah AH, Yassen GH, Liu WC, Goebel WS, Gregory RL, Platt JA. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *enterococcus faecalis* biofilm. Clin Oral Investig. 2015;19(8):2059-66.
19. Algarni A, Yassen G, Gregory R. Inhibitory effect of gels loaded with a low concentration of antibiotics against biofilm formation by *enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. J Oral Sci. 2015;57(3):213-8.
20. Reyhani M, Rahimi S, Fathi Z, Shakouie S, Milani A, Shokri J, et al. Evaluation of Antimicrobial Effects of Different Concentrations of Triple Antibiotic Paste on Mature Biofilm of *enterococcus faecalis*. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2015; 9(3): 138-43.
21. Bravo S. Efectos antibacterianos de las combinaciones alternativas de la droga 3Mix y MP sobre bacterias prevalentes en necrosis pulpar. [Tesis]. Lima: Facultad de Odontología, Universidad Mayor de San Marcos; 2015.
22. Akcay M, Arslan H, Yasa B, Kavrik F, Yasa E. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. J Endod. 2014;40(6):845-8.
23. Prather B, Ehrlich Y, Spolnik K, Platt J, Yassen G. Effects of two combinations of triple antibiotic paste used in endodontic regeneration on root microhardness and chemical structure of radicular dentine. J Oral Sci. 2014;56(4):245-51.

24. McTigue DJ, Subramanian K, Kumar A. Case series: management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Pediatr Dent.* 2013;35(1):55-60.
25. Gomez de Ferraris ME, Campos A. Embriología dental (Odontogénesis). *Histología, Embriología e Ingeniería tisular bucodental.* 3ª ed. México: Médica Panamericana; 2009. p. 113-136.
26. Torabinejad M, Walton R. *Endodoncia: principios y prácticas.* Barcelona: ELSEVIER; 2009.
27. Quiñones Márquez D. Patologías pulpares y periapicales más frecuentes en urgencias en 2 clínicas estomatológicas. *Rev Cubana Estomatol.* 2000; 37(2):84-8.
28. De Lima Machado M. Sustancias medicamentosas auxiliares en la desinfección y medicación intra – y extrarradicular. Machado M, Capp R, Di Spagna A, Keiti C, editores. *Endodoncia – Ciencia y tecnología.* Caracas: Amolca; 2016. p. 579-600.
29. Bergenholtz G, Horsted-Bindslev C. Complejo pulpa-dentina: estructura funciones y respuestas a influencias adversas. En: Olgart L, Bergenholtz G, autores. *Endodoncia.* México: Manual moderno; 2011. p. 11-30.
30. Bertran G, Rosales JL. Lesiones pulpares y periapicales en la consulta de Urgencia Estomatológica. Clínica "Felipe Soto" 2010-2011. *Rev haban cienc méd.* 2014; 13(1):94-100.
31. Parejo D, Garcia M, Montoro Y, Herrero L, Mayán G. Comportamiento de las enfermedades pulpares en la Escuela "Arides Estévez", La Habana, 2009. *Rev haban cienc méd.* 2014; 13(4):570-79.

32. Sesma A, Lara-Rossano A, Cervantes-Munguia E. Revascularización nueva opción de tratamiento a la apexificación. *Rev Oral*. 2010; 11(S2): 55-56.
33. Siqueira JF, Janeiro RD. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94(3):281-93.
34. Hargreaves K, Berman L, Cohen S. Diagnóstico. En: Cohen S, autor. *Cohen: Vías de la pulpa*. Barcelona: ELSEVIER; 2011. p. 3-39.
35. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):367-71.
36. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis*. 1993; 6(6):269-75.
37. Kargül B, Kadir T. The Antibacterial Effects of Ornidazole on Primary Molars with Infected Pulps. *International Journal of Experimental and clinical Chemotherapy*. 2001; 47(3):203-207.
38. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7(5): 257-62.
39. Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1990; 23(2):113-18.

40. Hoshino E, Takushige T. LSTR 3Mix-MP method-better and efficient clinical procedures of lesion sterilization and tissue repair (LSTR) therapy. *Dental Review*. 1998; 666:57-106.
41. Hoshino E. Sterilization of carious lesions by drugs. *Journal of the Japanese Association for Dental Science*. 1990; 9: 32-7.
42. Narayanan L, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010; 13(4): 233–39.
43. Torabinejad M, Walton R. Endodontic Microbiology. In: Siqueira JF, editor. *Endodontics: Principles and Practice*. Missouri: ELSEVIER; 2009. pp. 38-48.
44. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.
45. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005;31(7):488-98.
46. Shah HN, Collins DM. Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides. *Int J Syst Bacteriol*. 1990;40(2):205–8.
47. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod*. 1997;23(7):433–8.
48. Dahle UR, Titterud Sunde P, Tronstad L. Treponemas and endodontic infections. *Endod Top*. 2003; 6(1):160-70.

49. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):112–22.
50. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1274–87.
51. Glick M, Trope M, Bagasra O, Pliskin ME. Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991;71(6):733–6.
52. Slots J. Herpes viruses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2005;38:33–62.
53. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002;28(4):304–10.
54. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA – DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16(5):197–204.
55. Gopikrishna AV, Kandaswamy D, Jeyavel RK. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of five endodontic root canal sealers against *enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Conserv Dent.* 2006;9:2–12.
56. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308-20.
57. Comerlato CB, Resende MC, Caierão J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *enterococcus faecalis* and *enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(5):590-5.

58. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute 2016. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, Document M100-S21, CLSI, Wayne, 172 pp.
59. Negroni M. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los agentes antimicrobianos. En: Molgantini S, Manto M, autoras. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2a ed. Argentina: Panamericana EM; 2009. p. 543-50.
60. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Cultivos e identificación tradicionales. En: Forbes B, editor. Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. 12a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p. 93-119.
61. Herrera ML, Campos M. Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. Rev méd Hosp Nac Niños. 2005; 40(1): 09-15.
62. Zaragoza R, Gimeno C, Pemán J, Salavert M. Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. En: Cercenado E, Cantón R, autores. Microbiología aplicada al paciente crítico. Madrid: Médica Panamericana; 2007. p. 55- 68.
63. Chavez de Paz LE, Sedgley CM, Kishen A. The Root Canal Biofilm. 1ra ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015.
64. Soares IJ, Goldberg F. Endodoncia: Técnicas y Fundamentos. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2002.
65. Kayalvizhi G, Subramaniyan B, Suganya G. Topical Application of Antibiotics in Primary Teeth: An Overview. Journal Of Dentistry For Children. 2013; 80(2): 71-79.
66. United States Pharmacopeia 22nd revision. Rockville, MD, USA: The United States Pharmacopeial Convention, Inc; 1989.

67. Tripathi KD. Farmacología en Odontología: Fundamentos. 1ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
68. Kayalvizhi G. Role of antibiotics in paediatric endodontics. Endodontic Practice Today. 2010; 4(1): 41-48.
69. Cruz E, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. International Endodontic Journal. 2002; 35(4): 330-336.
70. Denari W. CTZ. Rev Assoc Paul Cirurg Dent. 1996;20(2):186-7.
71. Siegl R, Lenzi T, Politano G, De Benedetto M, Imparato J, Pinheiro S. Two endodontics techniques analysis in primary molars with fistula. RGO: Rev Gaúch Odontol. 2015; 63(2): 187-193.
72. González D, Trejo P, de León C, Carmona D. Técnica de endodoncia no instrumentada mediante el uso de la pasta CTZ. Rev. Estomat. 2010; 18(2):27-32.
73. Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamiento endodôntico de dentes decíduos com polpa morti ficada. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1981;35(3):240-5.
74. Guide to clinical Endodontics: AAE, 6th edition. Chicago; 2013.
75. Pinky C, Shashibhushan KK, Subbareddy VV. Endodontic treatment of necrosed primary teeth using two different combinations of antibacterial drugs: an in vivo study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2011;29(2):121-7.
76. Walther L. Endodontic treatment for primary molars. Rev Gaucha Odontol. 1965; 13(1):8-11.
77. Velásquez V, Alvarez M. Tratamiento pulpar en la apexificación del diente inmaduro mediante agregado de trióxido mineral. Odontología Sanmarquina. 2009;12(1):29-32.

78. Yassen GH, Chin J, Mohammedsharif AG, Alsoufy SS, Othman SS, Eckert G. The effect of frequency of calcium hydroxide dressing change and various pre- and inter-operative factors on the endodontic treatment of traumatized immature permanent incisors. *Dent Traumatol.* 2012;28(4):296-301.
79. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):1-8.
80. Namour M, Theys S. Pulp revascularization of immature permanent teeth: a review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:737503.
81. Obando Suárez M, Muralles Andrade J, Silva-Herzog Flores D, Cerda Cisterna B, de Jesús Pozos Guillén A. Medicación intraconducto utilizada para revascularización de dientes necróticos y formación radicular incompleta. *Revista ADM.* 2015; 72(3): 124-128.
82. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21(7):349-53.
83. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, et al. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012;38:1372–5.
84. Kobayashi M, Kagawa T, Takano R, et al. Effect of medium pH on the cytotoxicity of hydrophilic statins. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10:332–9.
85. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J.* 2013;46:688-95.

86. Sweeney LC, Dave J, Chambers PA, Heritage J. Antibiotic resistance in general dental practice - a cause for concern?. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 567-76.
87. Thibodeau B, Trope M. Pulp Revascularization of a Necrotic Infected Immature Permanent Tooth: Case Report and Review of the Literature. *Pediatric Dentistry*. 2007; 29(1): 47-50.
88. Brook I, Lewis M, Sándor G, Jeffcoat M, Samaranayake L, Rojas J. Clindamicina para el tratamiento de infecciones dentales. *Revista ADM*. 2007; 64(6): 230-237.
89. Schüssl Y, Pelz K, Kempf J, Otten J. Concentrations of amoxicillin and clindamycin in teeth following a single dose of oral medication. *Clinical Oral Investigations*. 2014; 18(1): 35-40.
90. Addy LD, Martin MV. Clindamycin and dentistry. *British Dental Journal* 2005; 199(1): 23–26.
91. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from the root canal. *Oral. Microbiol Immunol*. 2000; 15: 309-312.
92. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine (TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int EndodJ* 2012;45:439-48.
93. Wang X, Sun H, Chang J. Characterization of Ca₃SiO₅/CaCl₂ composite cement for dental application. *Dent Mater*. 2008;24:74-82.

94. About I, Laurent P, Tecles O. Bioactivity of Biodentine™ a CA_3SiO_5 -based Dentine Substitute. Oral session. IADR Congress July 2010, Barcelona, Spain.
95. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calciumsilicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod. J.* 2011;44:1081-7.
96. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ª ed. Ginebra: OMS; 2005.

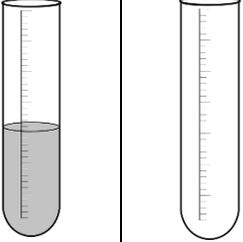
ANEXOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°1

FECHA

FICHA No

- 1) Marcar con un aspa el recuadro SI ó NO presenta turbidez o sedimento de acuerdo con cada asociación antibiótica de TAP/MTAP

TABLA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA PASTA TRIPLE ANTIBIÓTICA Y SU MODIFICACIÓN CON CLINDAMICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> SEGÚN SU TURBIDEZ O SEDIMENTO						
Turbidez/Sedimento		Concentraciones en $\mu\text{g/ml}$	Asociación de antibióticos			
SI	NO		Pasta Triple Antibiótica (TAP)		Pasta Triple Antibiótica Modificada (MTAP)	
		0.125 $\mu\text{g/ml}$	SI	NO	SI	NO
		0.25 $\mu\text{g/ml}$	NO	SI	SI	NO
		0.5 $\mu\text{g/ml}$	SI	NO	SI	NO
		1 $\mu\text{g/ml}$	SI	NO	SI	NO
		2 $\mu\text{g/ml}$	SI	NO	SI	NO

- 2) Encerrar con un círculo la/las Concentración (es) Mínima inhibitoria de ambos grupos

TABLA DE VALORES DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA PASTA TRIPLE ANTIBIÓTICA Y SU MODIFICACIÓN CON CLINDAMICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>						
Asociación antibiótica	Concentraciones					
Pasta Triple Antibiótica (TAP)	0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	No presenta
Pasta Triple Antibiótica Modificada (MTAP)	0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	No presenta

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°2

FECHA

FICHA No

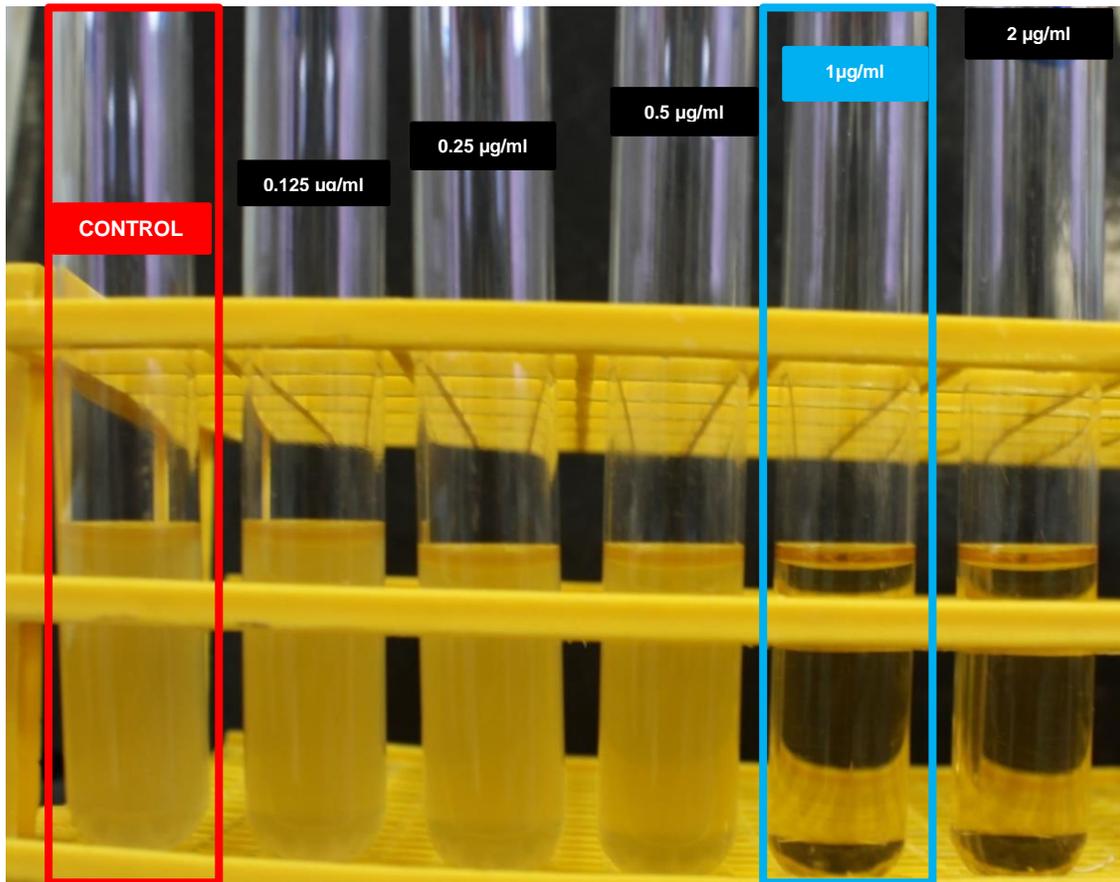
- 1) Encerrar con un círculo la/las Concentración (es) Mínima Bactericida del grupo TAP

TABLA DE VALORES DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DE LA PASTA TRIPLE ANTIBIÓTICA Y SU MODIFICACIÓN CON CLINDAMICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>						
Asociación antibiótica	Concentraciones					
Pasta Triple Antibiotica (TAP)	0.125 µg/ml	0.25 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	No presenta

- 2) Encerrar con un círculo la/las Concentración (es) Mínima Bactericida del grupo MTAP

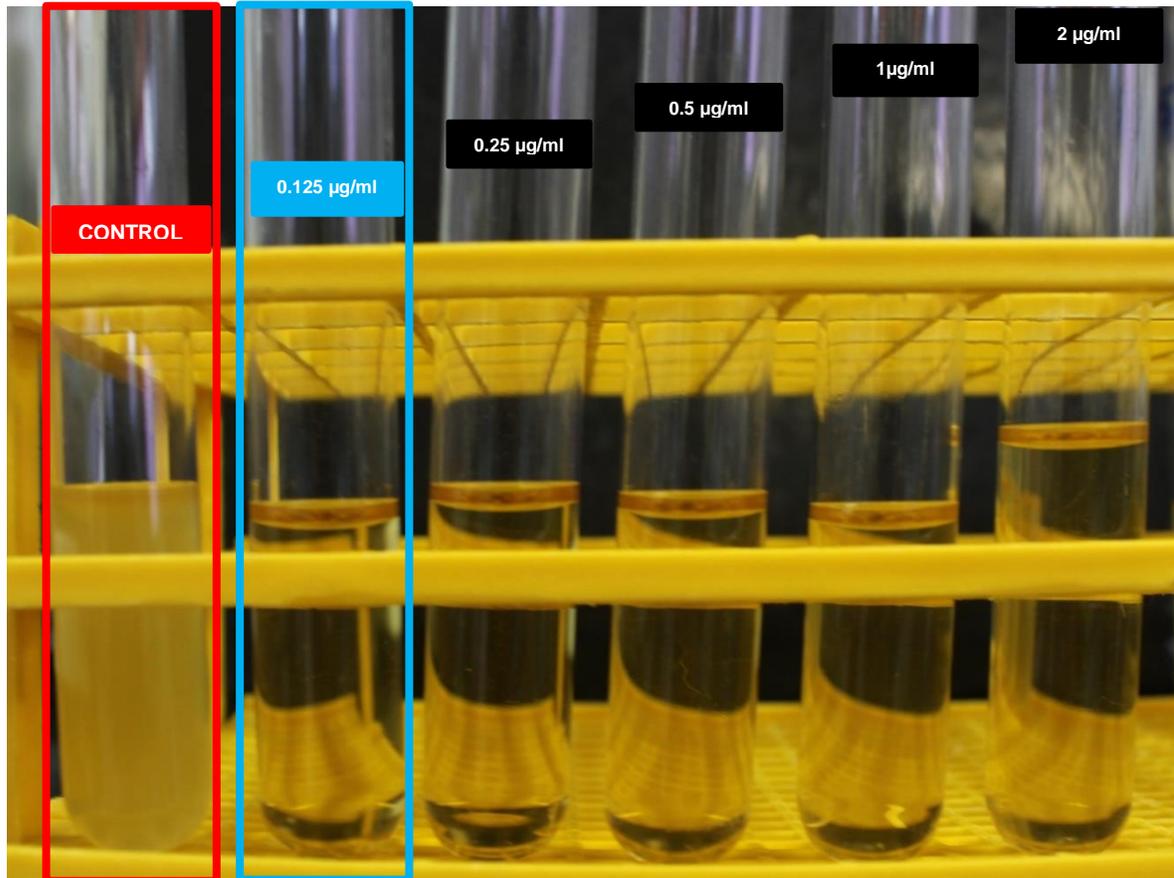
TABLA DE VALORES DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DE LA PASTA TRIPLE ANTIBIÓTICA Y SU MODIFICACIÓN CON CLINDAMICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>						
Asociación antibiótica	Concentraciones					
Pasta Triple Antibiotica (TAP)	0.125 µg/ml	0.25 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	No presenta

GRÁFICO N°:14 Concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml de pasta triple antibiótica (TAP) sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*



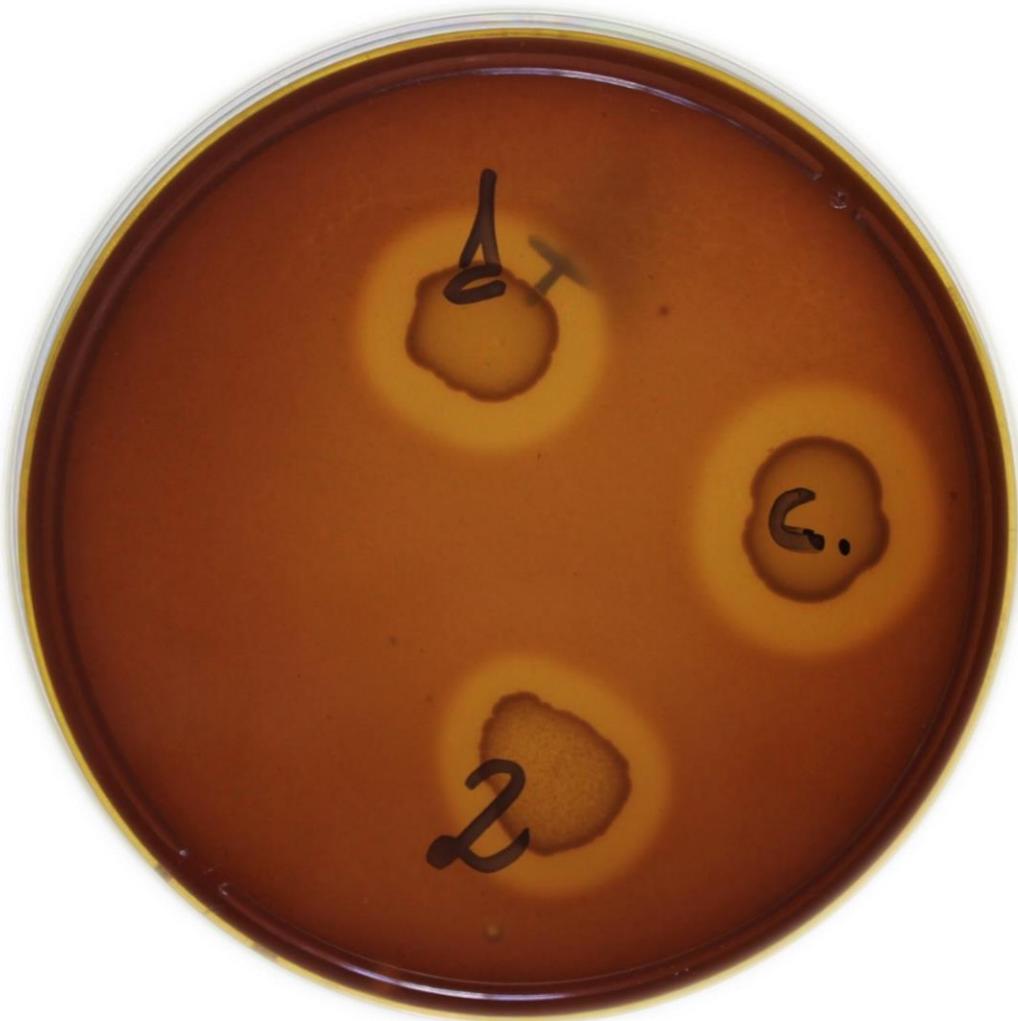
El gráfico muestra el método de dilución en caldo utilizando diferentes concentraciones de TAP; en combinación con el BHI y cepas de *E. faecalis* ajustados a una escala turbimétrica de McFarland de 0.5 en el control. Donde se muestra la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 1 µg/ml de TAP; siendo esta la concentración mínima inhibitoria para ambas repeticiones de la muestra.

GRÁFICO N°:15 Concentraciones de 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml de pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*



El gráfico muestra el método de dilución en caldo utilizando diferentes concentraciones de MTAP; en combinación con el BHI y cepas de *E. faecalis* ajustados a una escala turbimétrica de McFarland de 0.5 en el control. Donde se muestra la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 0.125 µg/ml de TAP; siendo esta la concentración mínima inhibitoria para ambas repeticiones de la muestra.

GRÁFICO N°:16 Identificación de la concentración mínima bactericida (MBC) de la pasta triple antibiótica (TAP) sobre cepas ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*



El gráfico muestra subcultivos de los tubos sin crecimiento bacteriano visible, obtenidos de la MIC del grupo TAP, colocados en placas con agar sangre y *E. faecalis*. Donde solo se observa la hemólisis que produce la cepa; mas no un efecto bactericida de la TAP, que nos evidencia que no existe una concentración mínima bactericida a las concentraciones establecidas en este estudio.

GRÁFICO N°:17 Identificación de la concentración mínima bactericida (MBC) de la pasta triple antibiótica modificada con clindamicina (MTAP) sobre cepas

ATCC® 29212 de *enterococcus faecalis*



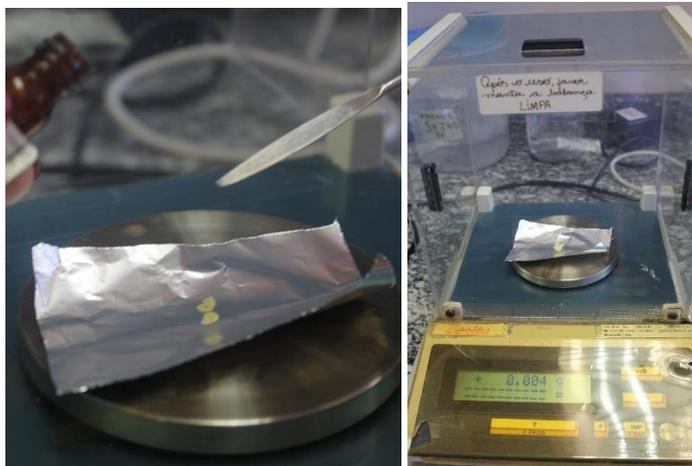
El gráfico muestra subcultivos de los tubos sin crecimiento bacteriano visible, obtenidos de la MIC del grupo MTAP, colocados en placas con agar sangre y *E. faecalis*. Donde se observa la hemólisis que produce la cepa en las concentraciones 0.125 µg/ml, 0.25µg/ml y el control. Siendo la concentración mínima bactericida 0.5 µg/ml de MTAP que se necesita para erradicar al 99.9% las cepas de *E. faecalis*.

ANEXO. 4 ELABORACIÓN DE LAS SOLUCIONES ANTIBIÓTICAS

**Minociclina Sigma-Aldrich®,
St Louis, MO**



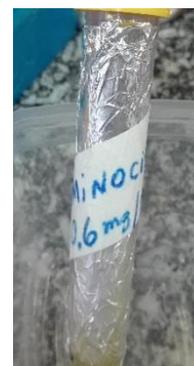
**Balanza electrónica de precisión
(Marte®, 0.001g, Brasil)**



**Solventes agua estéril
y alcohol de 92.8°**

**Agitador shaker tipo vórtex
(Benchmark®, USA)**

**Solución final de
minociclina**



**Soluciones antibióticas finales
de Ciprofloxacino, Clindamicina
y Metronidazol**

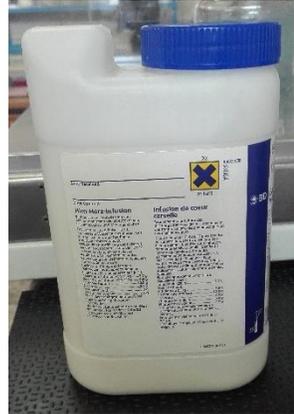


PROCESAMIENTO DEL INOCULO BACTERIANO EN INFUSIÓN CEREBRO-CORAZÓN

Material biológico procesado
cepas de *enterococcus faecalis*



Infusión Cerebro-Corazón
(BHI)



Inoculo bacteriano
en caldo BHI



Serie de tubos de ensayo con 5ml
de BHI enriquecido y 100µL de *E. faecalis*



Serie incubada en una estufa de cultura
(FANEM LTDA, Modelo 002 CB, Brasil)
a 37° C por 24 horas
para su crecimiento



PREPARACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES PARA OBTENER LA MIC

Solución de antibióticos en stock

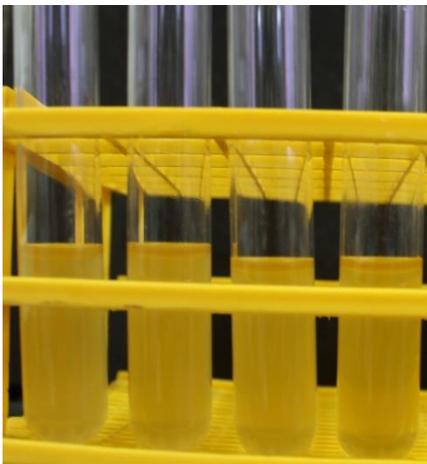


Colocación de las soluciones antibióticas de los grupos TAP y MTAP sobre 5ml de BHI y 100µL de *E. faecalis*



Concentraciones finales de TAP/MTAP con 5ml de BHI y 100µL de *E. faecalis*

Incubación por 24 horas a 37° C



EXTRACCIÓN DE SUBCULTIVOS DE LA MIC PARA OBTENER LA MBC

**Inoculación del *E. faecalis*
sobre agar sangre**



**Colocación de 25 μ L de subcultivo
de resultados de la MIC. Grupo TAP**



**Colocación de 25 μ L de subcultivo
de resultados de la MIC. Grupo MTAP**



**Presentación final de subcultivos de
la MIC de los grupos TAP/MTAP**



Incubación por 24 h a 37° C para su posterior lectura





DEPARTAMENTO DE
MIcroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Laboratório de Anaeróbios, Sala 242, 2º andar. Av. Professor Lineu Prestes, 1374 - ICB II - 05508-000, Cidade Universitária
"Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP. Telefone +55-11-3091-7344. Fax +55-11-3091-7354.
<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a aluna Candy Genesis Gutierrez Ortiz realizou parte experimental de seu trabalho de pesquisa para obtenção do título de Cirurgião-Dentista na Universidad Norbert Wiener, Lima-Perú. Iniciou suas atividades no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB-USP no dia 3/4/2017 até 13/4/2017. Nesta ocasião foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) com duas pastas antibióticas usadas na terapia pulpar contra o agente *Enterococcus faecalis*. Além, disso a aluna Gutierrez participou de seminários do Laboratório de Anaeróbios. São Paulo, 13 de abril de 2017.

Dr. Mario Julio Avila-Campos
Professor Titular do Departamento de Microbiologia
Prof. Dr. Mario Juli.
Avila Campos
Laboratório de Anaeróbios