



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS Y POSGRADO CUEPI

ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA

TESIS

EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS POSINSTRUMENTACIÓN A DOS DIÁMETROS APICALES DIFERENTES.

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA.

PRESENTA:

C.D. CARLOS EUTIMIO DIAZ CERRATO

ASESOR DE TESIS: C.D.E.E. FERNANDO FERNÁNDEZ TREVIÑO.

ASESOR METODOLOGICO: DRA. DEYANIRA SERRATO OCHOA.

COASESOR: Q.F.B. RODRIGO DÍAZ BALCAZAR.

COASESOR: DC. RAFAEL ORTÍZ ALVARADO.

MORELIA, MICHOACÁN

MÉXICO

2012

PROPUESTA PARA LA EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS POSTINSTRUMENTACIÓN A DOS DIÁMETROS APICALES DIFERENTES.

ACTA DE REVISIÓN

Índice:	Págs.
1. Acta de revisión.....	3
2. Glosario.....	5
3. Relación de figuras y tablas.....	6-16
4. Resumen.....	17-18
5. Palabras clave.....	18
6. Introducción.....	19-20
7. Antecedentes.....	21-64
8. Justificación.....	65
9. Objetivo general y específico.....	66
10. Hipótesis.....	67
11. Materiales y métodos.....	68
12. Resultados.....	69-82
13. Análisis y discusión.....	83-84
14. Conclusiones.....	85
15. Recomendaciones	86
16. Anexos.....	87-88
17. Bibliografía.....	89-95

Glosario

Colonización Bacteriana: Es la capacidad bacteriana de llegar a la superficie del huésped por una puerta de entrada (piel o mucosas), formar o establecer una colonia en el epitelio y resistir la acción de los sistemas locales de defensa.

Recolonización Bacteriana: Capacidad bacteriana de colonizar nuevamente la superficie hospedera.

Tratamiento Endodóntico: Comprende todos aquellos procedimientos dirigidos a mantener la salud de la pulpa dental o de parte de la misma.

Carga Bacteriana: Es la cantidad de bacterias que pueda contener algo.

Biopelícula: Comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

PCR: La PCR o "Reacción en Cadena de la Polimerasa" es una técnica biomédica que permite obtener grandes cantidades de secuencias moleculares de ADN o ARN replicados, a partir de muestras en muy pequeñas cantidades de estas (ADN o ARN).

Preparación Biomecánica: Acto operatorio que consiste en procurar tener acceso directo y franco a las proximidades de la unión cemento-dentina-conducto, logrando una adecuada extirpación de la pulpa, liberación del conducto de restos pulpares o material necrótico, preparando a continuación el conducto dentario con el fin de atribuirle una forma cónica para la completa desinfección y recibir una fácil y perfecta obturación.

Conductometría: Consiste en determinar la longitud precisa entre la constricción apical de cada conducto y el borde incisal o la cara oclusal del diente en tratamiento, considerando como longitud óptima 0,5 a 1 y hasta 2mm. del ápice radiográfico.

Relación de figuras y tablas



Figura 1.Acumulación de una biopelícula sobre los tejidos dentarios.

Tomado de <http://detododental.blogspot.mx/2011/04/que-es-placa-dental.html>

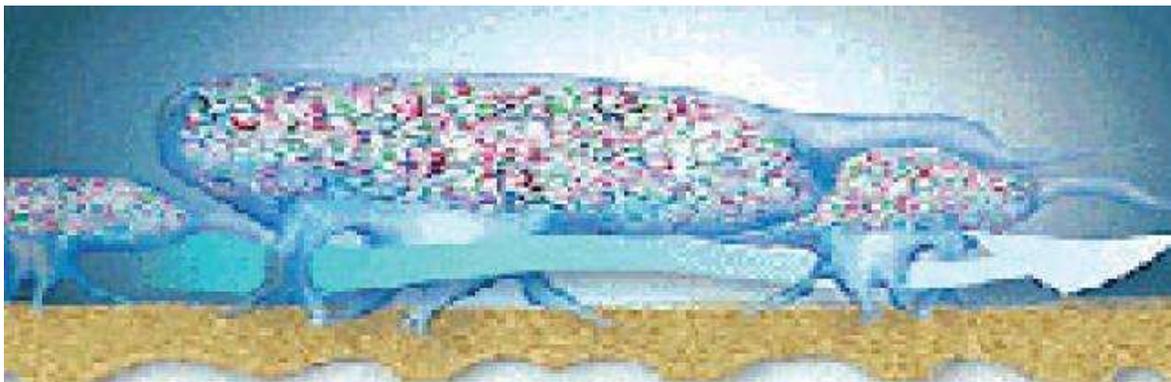


Figura 2.Estructura del biofilm.

Tomada de http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s1138-123x2005000400005&script=sci_arttext.



Figura 3. Presencia de caries dental atribuida a la acumulación de placa bacteriana.

Tomada de Atlas de Endodoncia Página 6 Cap. 1 Patobiología y Diagnóstico

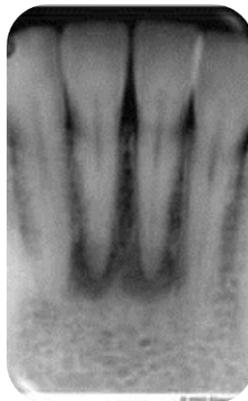


Figura 4. Presencia de una lesión periapical ocasionada por una pulpopatía.

Tomada de

[http://imaging.consult.com/image/chapter/Musculoskeletal?title=Dental%20Imaging
&image=fig58&locator=gr58a&pii=S1933-0332\(07\)76002-0](http://imaging.consult.com/image/chapter/Musculoskeletal?title=Dental%20Imaging&image=fig58&locator=gr58a&pii=S1933-0332(07)76002-0)



Figura 5.Hipoclorito de sodio uso endodóntico.

Tomado de <http://www.dentalartigas.com.ar/artigas,%20medicamento.htm>

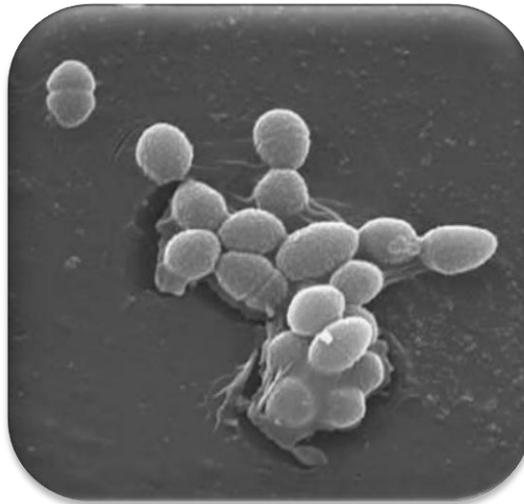


Figura6.*Enterococcus faecalis*.

Tomada de http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis

Grupo	Especie
<p>Grupo I</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. ayium.</i></p> <p><i>E. gilvus.</i></p> <p><i>E. malodoratos.</i></p> <p><i>E. pallens.</i></p> <p><i>E. pseudoavium.</i></p> <p><i>E. raffinosus.</i></p> <p><i>E. saccharolyticus.</i></p>
<p>Grupo II</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. faecalis.</i></p> <p><i>E. faecium.</i></p> <p><i>E. casseliflavus.</i></p> <p><i>E. gallinarum.</i></p> <p><i>E. mundt.</i></p> <p><i>Lactococcus.</i></p>
<p>Grupo III</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. dispar.</i></p> <p><i>E. durans.</i></p> <p><i>E. hiare.</i></p> <p><i>E. porcinus (E. villorun).</i></p> <p><i>E. ratti.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. asini.</i></p> <p><i>E. ceconum.</i></p> <p><i>E. sulfureus.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. columbae.</i></p> <p><i>Vagococcus sp.</i></p>

Tabla 1 Categorización de las especies de *Enterococcus*.

Tomada de *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment.

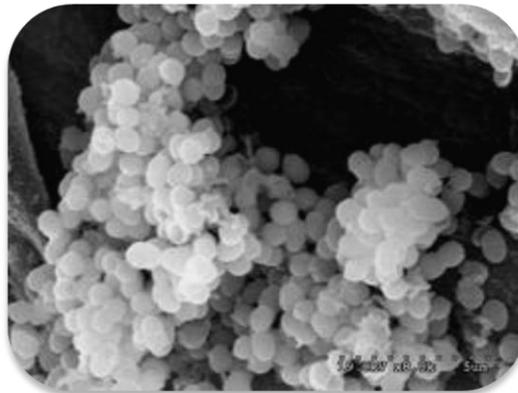


Figura 7. Biopelícula formada por *E. faecalis*

Tomada de <http://kimberlyklinelab.com/research/index.html>

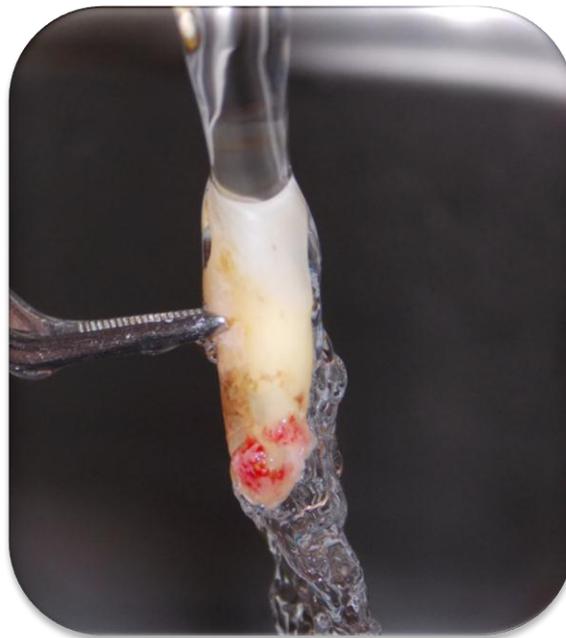


Figura 8. Limpieza bajo el chorro de agua del órgano dentario a incluir dentro del estudio. Fotografía tomada por el autor de la tesis.



Figura 9. Remoción de restos de tejido. Imagen tomada por el autor de la tesis.



Figura 10. Estandarización de la longitud radicular. Imagen tomada por el autor de la tesis.

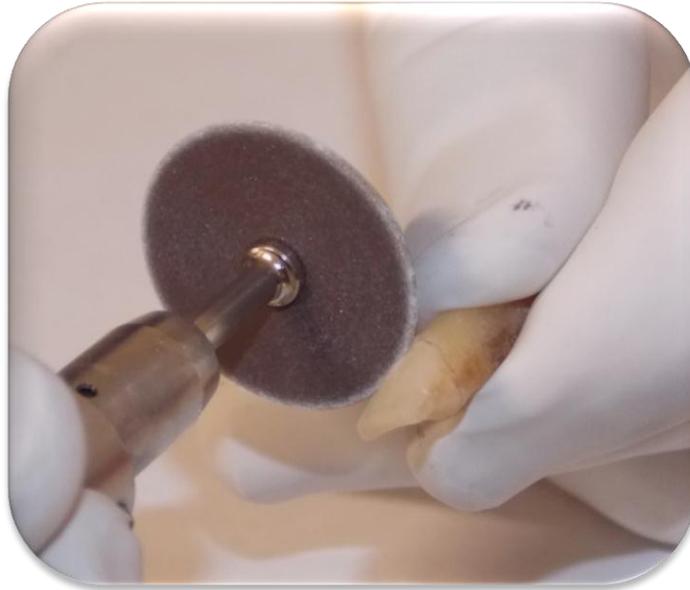


Figura 11. Decoronación de los órganos dentarios. Imagen tomada por el autor de la tesis.

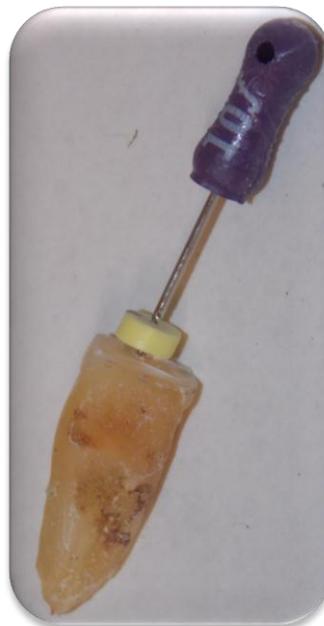


Figura 12. Permeabilización de los conductos.

Imagen tomada por el autor de la tesis



Figura 13. Horno para esterilización de las muestras.

Tomada de <http://wisevigor.en.made-in-china.com/product/eoRQNPLGgIkh/China-En-13060-Class-B-Vacuum-Table-Top-Dental-Autoclave-Sterilizer-STE-18L-Z-.html>



Figura14. Contenedores esterclave para almacenamiento y esterilización de las muestras.

Tomada de <http://www.promosadental.com/esterilizadores.html>

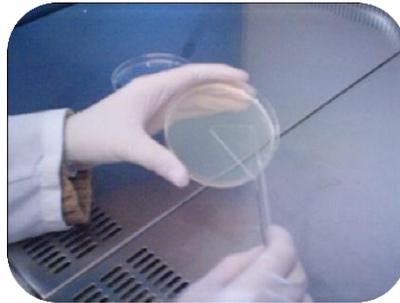


Figura 15. Siembra de la cepa.

Tomada de <http://www.ugr.es/~mgarrido/Protocolos.html>



Figura 16. Cultivo de *E. Faecalis*

Tomada de <http://superdinosaurioazul.blogspot.mx/2011/11/especies-patogenas.html>



Fig. 17 Recolección de las cepas bacterianas.

Tomada de
<http://dentizta.ccadet.unam.mx/Instrumenta/contenido/practicas/bacteriologia/solidos.htm>

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Tabla 2 Escala de Mc Farland

Tomada de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>

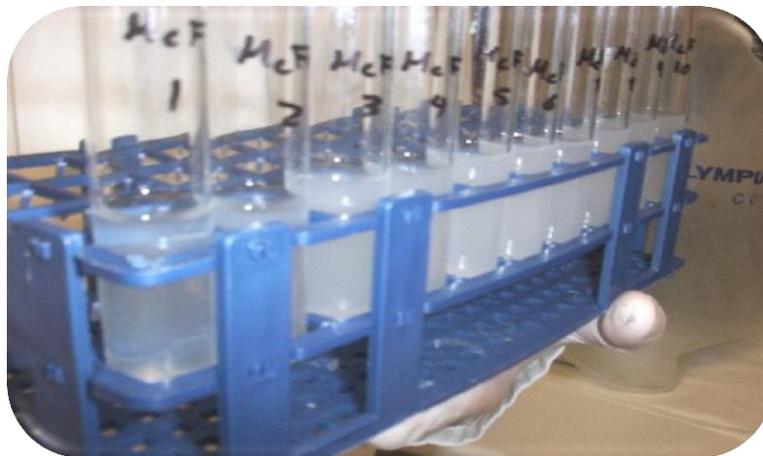


Figura 18. Escala de Mc Farland

Tomada de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>



Figura 19. Kit utilizado para extracción de ácidos nucleicos de nueva generación ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep.

Tomada de <http://www.alkaliscientific.com/en/221-total-rna-purification-kits>

RESUMEN:

EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS POSINSTRUMENTACIÓN A DOS DIÁMETROS APICALES DIFERENTES.

En base a las revisiones bibliográficas, se ha determinado que una de las causas de fracaso dentro del tratamiento de endodóntico, es la recolonización bacteriana, la cual se presenta por una limpieza deficiente del sistema de conductos radiculares, permitiéndole a las bacterias remanentes post-instrumentación, recolonizar el interior del sistema de conductos, impidiendo que se logre restaurar un equilibrio biológico, y esto, ocasiona que el estado patológico periapical se mantenga. El hipoclorito de sodio es uno de los agentes irrigantes mas utilizados dentro de la limpieza de los conductos radiculares gracias a sus propiedades químicas y bactericidas que, en combinación con el ultrasonido, logran eliminar en mayor cantidad la carga bacteriana (que existe) dentro del conducto radicular, incluyendo microorganismos tales como: el *E. Faecalis*, los cuales presentan una gran capacidad adaptativa y una virulencia muy elevada. El incremento en los diámetros de preparación apical, nos ayudará a eliminar, en mayor proporción, parte del tejido contaminado por los microorganismos, dándonos como resultado, una mejor limpieza y desinfección intracanal, con lo cual, nuestro pronóstico post-tratamiento será más favorable.

OBJETIVO

Establecer, en base a la los textos analizados, la metodología más adecuada para comparar *in vitro* el efecto de dos diámetros de preparación, sobre la reducción de colonias bacterianas.

MATERIALES Y METODOS

Considerando las posibles causas de los fracasos endodónticos, encontramos que algunos estudios mencionan como una de las más frecuentes, la recolonización bacteriana, la cual se debe a una limpieza deficiente del sistema de conductos radiculares, una de las cepas más frecuentemente aisladas en infecciones perirradiculares persistentes es el *E. Faecalis*, que debido a sus propiedades adaptativas y a su virulencia, el hipoclorito de sodio en combinación con el uso de ultrasonido no son herramientas suficientes para poder asegurar una terapia de conductos exitosa; pero, algunos autores lo mencionan como un auxiliar más para

la limpieza y desinfección de los conductos radiculares. Además de incrementar los diámetros de preparación apical, permitiendo con esto, eliminar una mayor cantidad de bacterias existentes dentro del sistema de conductos radiculares.

RESULTADO. La metodología que se propone con este trabajo es la siguiente: inocular con *E. Faecalis* cada una de las muestras, incubar y realizar los análisis pre y post instrumentación a dos diámetros apicales diferentes para llevar a cabo un conteo bacteriano, mediante un estudio genético por medio de la PCR, y determinar si se encontraron diferencias entre cada grupo incluido dentro del estudio.

CONCLUSIONES. Los resultados de este trabajo, nos ayudarán a determinar qué tan importante es el diámetro final de preparación apical, para poder realizar una mejor limpieza del interior del sistema de conductos radiculares y así evitar, en lo posible, la recolonización bacteriana, con lo cual, obtendremos una mayor probabilidad de éxito en nuestros tratamientos.

Palabras clave:

- Tratamiento endodóntico.
- Recolonización.
- Diámetro de terminación apical.
- Carga bacteriana.
- *E. Faecalis*.
- PCR

INTRODUCCIÓN:

Estudios microbiológicos, morfológicos e inmunológicos, han demostrado que la colonización de la superficie dentaria por parte de bacterias patógenas se acompaña por mecanismos de defensa celulares y humorales. La carga bacteriana y los mecanismos de defensa alteran el equilibrio biológico existente, desencadenando una serie de patologías y afecciones al tejido pulpar, donde podemos encontrar etapas de progresión y estancamiento de la misma patología, influenciadas por el sistema de defensa del organismo. En estudios histológicos, esta dinámica cambiante puede durar días, meses o años y desencadenar, finalmente, una afección de tipo irreversible, ocasionando un proceso de necrosis en el tejido pulpar.

Con el paso de la caries del esmalte a la dentina, se producen las primeras reacciones inflamatorias de la pulpa. Histológicamente encontramos granulocitos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Mientras las bacterias se introducen en los tubulillos dentinarios, los granulocitos y neutrófilos se desplazan en dirección a las entradas de los mismos, limitadas por la pulpa, se descomponen y liberan enzimas lisosomales, produciendo una destrucción del tejido pulpar (Langeland *et. al.*, 1973).

Las sustancias que aumentan la reacción inflamatoria, son las bacterias y sus productos de metabolismo, desecho y descomposición de la dentina afectada. En este punto se establece un círculo vicioso, desarrollando una pulpitis irreversible (Langeland *et. al.*, 1981).

En la periferia de la zona necrótica, la pulpa contiene granulocitos y neutrófilos que fagocitan a las bacterias. De esta forma, se licua todo el tejido pulpar, con lo cual el proceso se extiende en sentido apical y provoca una necrosis del paquete neurovascular. Además de que el proceso degenerativo sigue avanzando, hasta afectar tejidos periapicales.

Las bacterias localizadas en el interior del sistema de conductos radiculares son las responsables de la patología pulpar y eliminarlas del sitio donde se albergan, es parte de la terapia de conductos. Además, es fundamental para el cese de la afección, por lo que la limpieza y conformación biomecánica del conducto son indispensables para obtener los mejores resultados e incrementar las posibilidades de éxito dentro del tratamiento, incluyendo, un mejor pronóstico para el órgano dentario a tratar.

Los diámetros de preparación apical son de gran controversia dentro de los investigadores y clínicos ya que algunos mencionan que a mayor diámetro de preparación hay un menor respeto por los tejidos duros que conforman al órgano dentario; pero, otros dicen que entre más tejido se respete, mayor respeto se tiene a las bacterias existentes en el interior del sistema de conductos radiculares, dando lugar a una recolonización bacteriana y un fracaso en el tratamiento, por lo que ellos recomiendan diámetros mayores de terminación apical.

ANTECEDENTES

El rol de las bacterias y sus productos en la iniciación, propagación y persistencia de enfermedades pulpares y afecciones perirradiculares ha sido documentado y demostrado con anterioridad (Takehashi *et.al*, 1967).

Se han llegado a aislar y caracterizar hasta 200 especies distintas en una misma cavidad bucal; la mayor parte tendría la característica de ser transitoria, de forma que, como residente, solo quedarían aproximadamente unos 20 géneros y especies (Ureña,1995).

Microorganismos aislados más frecuentemente:

- *Staphylococcus aureus*.
- *Streptococos orales*.
- *Peptoestreptococcus spp.*
- *Actinomyces spp.*
- *Eubacterium spp.*
- *Capnocytophaga spp.*

- *Campylobacter spp.*
- *Eikenella corrodens.*
- *Porphyromonas spp.*
- *Prevotella spp.*
- *Mitsuokella dentalis.*
- *Selenomonas spp.*
- *Lactobacillus spp.*
- *Veillonella spp.*
- *Enterococcus spp.*
- *Treponemas orales.*

(Ureña, 1995).

Los principales microorganismos que constituyen la microbiota oral son los siguientes:

COCOS GRAM-POSITIVOS. Con gran diferencia sobre los demás son los *Streptococos* del grupo *viridans* los más aislados, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los ecosistemas orales, en menor proporción se hallarían *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *S. mucilaginosus*, *Abiotrophia spp.*, y los anaerobios estrictos *Peptoestreptococcus spp* (Ureña, 1995).

COCOS GRAM-NEGATIVOS. Se detectan diversas especies, anaerobias y comensales no exigentes, del género *Neisseria* y otras pertenecientes al género *Veillonella* como anaerobias estrictas (Ureña, 1995).

BACILOS GRAM-POSITIVOS. Numerosos bacilos grampositivos y elementos filamentosos pleomórficos, se aíslan de la cavidad oral. Destacan un número amplio de especies de los géneros *Actinomyces* y *Lactobacillus* y, en menor cantidad, *Corynebacterium matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, especies de *Propionibacterium* y las pertenecientes a los géneros anaerobios *Eubacterium* y *Bifidobacterium*. Otras bacterias no bien identificadas se incluyen habitualmente bajo el término vago e impreciso de difteroides o difteromorfos, por su forma similar a las corinebacterias (Ureña, 1995).

BACILOS GRAM-NEGATIVOS. Sobresalen por su importancia los anaerobios estrictos no esporulados como *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*,

Fusobacterium spp., *Leptotrichia buccalis*, *selenomonas spp.*, y *Centipeda periodonii*. Igualmente destacan como bacterias anaerobias facultativas:

Actinobacillus actinomycetemcomitans, *Haemophilus spp.*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp.*, y algunas especies del genero *Campylobacter*.

OTROS MICROORGANISMOS. Entre ellos sobresalen los treponemas comensales, hongos como *Candida spp.*, *Mycoplasma spp.*, y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral como las especies *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis* (Ureña, 1995).

La forma natural de crecimiento de las bacterias en la cavidad oral es a través del biofilm.

Con la aparición del microscopio óptico, Anthony Van Leeuwenhoek observó en 1683 que la placa dental estaba compuesta por depósitos blandos con microbios y restos de comida. Posteriormente, en 1898, Black definió la placa dental, como placas blandas gelatinosas. En 1970, en el congreso de Edimburgo, se definió la placa dental como microorganismos más polisacáridos extracelulares; esta placa dental estaba recubierta por leucocitos, células epiteliales y restos de comida. En los años 90, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio confocal de láser, se llegó a un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura, y se

desarrolló el modelo de la placa dental como biofilm (Bernimoulin, 2003; Marsh, 1995; Costerton *et. al.*, 1995).

Tiempo más tarde, Costerton definió el biofilm como: «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan *et. al.*, 2002).

Los biofilms pueden desarrollarse por medio de dos tipos de procesos:

- A partir de una célula planctónica
- A partir de otro biofilm

A partir de una célula planctónica.

Ciertas bacterias muestran o tienen la capacidad de desarrollar estructuras de superficie que favorecen la adhesión de las mismas a una superficie sólida, tales como fimbrias y fibrillas. Así, colonizadores primarios como *Actinomyces naeslundii*, varias especies de estreptococos, como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus mitis*, muestran fimbrias y fibrillas en su superficie. Otros factores que favorecen la adhesión de las bacterias a una superficie son la capacidad que muestran algunas especies bacterianas para el

movimiento, como la *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, o la expresión de ciertas proteínas en su superficie celular, denominadas adhesinas.

Existen una serie de factores que afectan a la adhesión de las bacterias a una superficie sólida. Por un lado, factores físicos y químicos de la superficie, como su rugosidad y composición química, y factores del medio líquido en el que se desarrolla, como la velocidad del flujo y la composición química del mismo (Socransky *et.al.*, 2003; Quirynen *et.al.*, 1995).

Una vez que las bacterias están ya adheridas a una superficie sólida (Fig. 1), se produce la expresión de ciertos genes que las diferencian de las formas planctónicas. Posteriormente se produce la multiplicación de la especie bacteriana y la coagregación con otras especies bacterianas. Dentro del biofilm, esta asociación de especies no sería aleatoria, sino que existirían asociaciones específicas entre bacterias dentro del biofilm.

A partir de otro biofilm

Los biofilms también se pueden desarrollar a partir de células sueltas desprendidas de un biofilm o de partes del propio biofilm. En cualquier caso, estas células desprendidas mantendrían todas las propiedades del biofilm de donde

proceden. También se han descrito fenómenos de movimiento del biofilm sobre la superficie a la que se encuentra fijado (Socransky *et.al.*, 2003).



Figura 1.Acumulación de una biopelícula sobre los tejidos dentarios.

Tomado de <http://detododental.blogspot.mx/2011/04/que-es-placa-dental.html>

Un biofilm es la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias (Costerton *et.al.*, 1987).

Cuando se observa un biofilm con el microscopio confocal de láser, pueden observarse las distintas comunidades bacterianas (dentro de las cuales pueden presentarse vacíos) organizadas en forma de torre y separadas entre sí por microcanales de agua (fig. 2) (Sbordone *et.al.*, 2003).

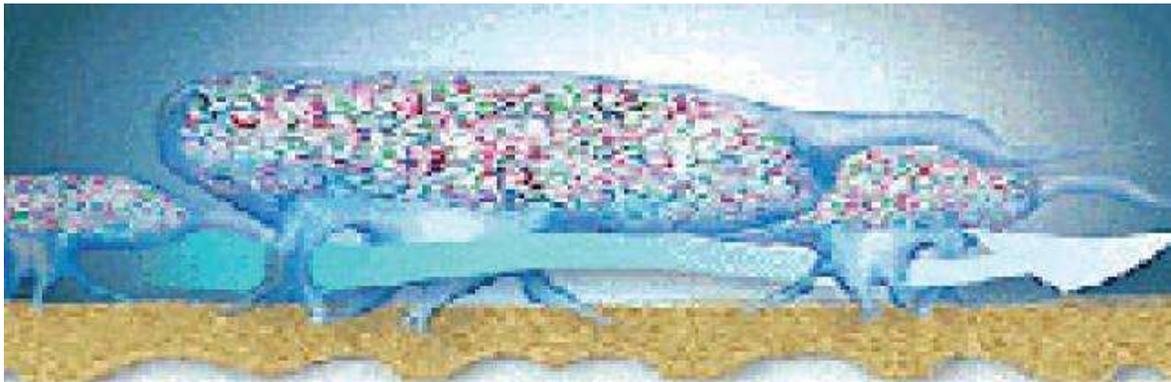


Figura 2. Estructura del biofilm.

Tomada de http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s1138-123x2005000400005&script=sci_arttext.

Enfermedades causadas por los biofilms

Al penetrar en el organismo, las bacterias producen una serie de enfermedades infecciosas que pueden clasificarse en:

Agudas: producidas por agentes exógenos, tienen un inicio rápido y se desarrollan en días o semanas. Los microorganismos o sus productos entran en el cuerpo. La infección se suele resolver de forma rápida. Ejemplos de este tipo de infecciones son los abscesos locales producidos por *Staphylococcus aureus*, las infecciones de las vías respiratorias superiores o las infecciones gastrointestinales.

Crónicas: están producidas por microorganismos exógenos que penetran en el organismo y persisten durante largos periodos, ya que las defensas del organismo no son capaces de eliminarlos. La lepra y la tuberculosis son ejemplos de este tipo de infecciones.

Retardadas: los signos y síntomas de la enfermedad no aparecen hasta meses o años tras la infección inicial. Las lesiones producidas pueden persistir toda la vida. Se caracterizan por un inicio poco evidente, para manifestarse posteriormente con otros síntomas y signos (Donian *et.al.*, 2002).

Distintos estudios microbiológicos, epidemiológicos y morfológicos han demostrado que la colonización de la superficie bacteriana por parte de microorganismos patógenos se acompaña en todas las formas de mecanismos de defensa humorales y celulares del organismo.

La formación de biopelícula sobre la superficie de los órganos dentarios, además de la agregación bacteriana a la misma, van a desencadenar diversas patologías sobre los órganos dentarios y tejidos adyacentes lo que a la larga puede incurrir en diversas afecciones.

Una de las afecciones que con mayor frecuencia se desarrolla, como consecuencia de la biopelícula y las bacterias que en ella se encuentran, además de los desechos que estas producen, es la caries dental (Fig. 3). La caries dental

es una enfermedad infecciosa polimicrobiana, donde cada especie bacteriana individual puede contribuir colectivamente a la cariogenicidad total de la biocomunidad de la placa dental (Marchant *et.al.*, 2001; Milnes *et.al.*, 1985; Costerton, 1995; Kolenbrander *et.al.*, 1990).



Figura 3. Presencia de caries dental atribuida a la acumulación de placa bacteriana.

Tomada de Atlas de Endodoncia Pagina 6 Cap. 1 Patobiología y Diagnostico

La manifestación de la caries dental está mediada por mecanismos complejos que son iniciados por diversos factores, entre los que se incluyen: genéticos, conductuales, ambientales y microbianos (Corby *et. al.*, 2005;).

En el caso de los factores microbianos, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones de caries, sin bacterias no hay lesión (Beighton, 2005).

Para el inicio y progresión de la lesión cariosa, es esencial que las especies bacterianas involucradas tengan la habilidad de producir ácido (acidogénicas) y tolerar un medio de pH bajo (acidúricas). Además, debe considerarse también la virulencia particular de especies capaces de producir polímeros de sacarosa, y otras especies que aprovechan esta matriz de polímeros para su adherencia y colonización. A través de este mecanismo, estas últimas especies estarían involucradas en el inicio de la lesión de caries dental. La placa dental asociada a caries dental, contiene altas proporciones de bacterias acidogénicas y acidúricas en comparación con la placa dental asociada a sujetos libres de caries dental (Beighton, 2005; Lingstrom *et.al.*, 2000).

Microorganismos bucales asociados a caries dental

A medida que la lesión de caries progresa, se da una transición de bacterias anaerobias facultativas Gram-positivas, que predominan en las etapas iniciales de la lesión, a bacterias anaerobias estrictas Gram-positivas y Gram-negativas que predominan en lesiones de caries avanzadas. Los factores que determinan esta sucesión microbiana son desconocidos. Entre las bacterias asociadas con el inicio, progresión o avance de la lesión de caries dental citamos: (Hoshino, 1985; Brailsford *et.al.*, 2001).

Streptococcus

Son cocos Gram-positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos o largas, los cuales miden de 0,5 a 0,8 μm de diámetro, anaerobios facultativos, comprenden parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas, pero también son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa, entre otras.

En la cavidad bucal se han aislado *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sanguinis* (*Streptococcus sanguis*), *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus oligofermentans*. De todas estas especies *S Streptococcus mutans* ha sido la más estudiada (Schûpbach *et. al.*, 1996; Nakajo *et. al.*, 2006; Tong *et.al.*, 2003).

Lactobacillus

Son bacilos Gram-positivos, anaerobios facultativos, acidógenos y acidúricos, pH cercanos a 5, favorecen su crecimiento, así como el inicio de su actividad proteolítica. Algunas cepas sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa, pero se adhieren muy poco a superficies lisas, por lo que deben utilizar otros mecanismos para colonizar las superficies dentarias. Entre estos mecanismos podemos mencionar la unión física por atrapamiento en superficies

retentivas, tales como: fosas y fisuras oclusales o caries cavitada, coagregación con otras especies bacterianas, constituyendo la biopelícula dental (Baca *et.al.*, 2002; Tanzer *et.al.*, 2001; Loesche *et.al.*, 1986).

De acuerdo a la actividad metabólica sobre los hidratos de carbono, *Lactobacillus* es clasificado en Grupo I, II y III. Entre el Grupo I se encuentran *L.delbrueckii* y *L.salivarius* y son homofermentativos; en el Grupo II, que son heterofermentativos facultativos, se encuentran *L.casei*, y *L.plantarum* y en el Grupo III son heterofermentativos estrictos, donde se encuentra *L.fermentum* y *L.oris*. En presencia de gluconato se comportan como heterofermentativos estrictos, produciendo acetato, etanol, formato, lactato y CO₂. En presencia de glucosa, se comportan como homofermentativos produciendo lactato sin CO₂, pero como producen la enzima piruvato-formato liasa, pueden producir acetato, etanol y formato, pero sin CO₂ (Baca, 2002).

Entre las especies de *Lactobacillus* aisladas en lesiones de caries dentinaria se distinguen: *L.casei*, *L.paracasei*, *L.rhamnosus*, *L.gasseri*, *L.ultunensis*, *L.salivarius*, *L.crispatus*, *L.fermentum*, *L.panis*, *L.nagelli*, *L.delbrueckii* y *L.gallinarum* (Byun *et.al.*, 2004; Munson *et.al.*, 2004; Chhour, 2005).

Actinomyces

Son bacilos filamentosos Gram-positivos, anaerobios y heterofermentativos. Son inmóviles y su tamaño varía entre 1 y 4 µm aproximadamente. Producen una

mezcla de ácidos orgánicos, como productos finales, tales como: succínico, láctico o acético. Entre los factores que determinan su virulencia se considera la presencia de fimbrias, que contribuyen con fenómenos de adhesión, agregación y congregación y la producción de enzimas proteolíticas como la neuraminidasa, esta última es de gran importancia cuando las lesiones de caries progresan a dentina profunda (Cisar *et.al.*, 1989; Kolenbrander *et.al.*, 1990; Baca *et. al.*, 2002).

Bifidobacterium

Son bacilos anaeróbicos, Gram-positivos, inmóviles, con frecuencia se agrupan en formaciones ramificadas, están presentes generalmente en el tracto gastrointestinal sano de humanos y animales (Baca *et.al.*, 2002; Scardovi *et.al.*, 1986).

En 1974, Scardovi y Crociani describieron especies de *Bifidobacterium dentium* aislados de caries dental en humanos. También se logró aislar algunas cepas de la caries dental como la *Bifidobacterium* y las identificaron como *B. dentium* (Beerens *et.al.*, 1957).

Se analizó la existencia y a las especies predominantes pertenecientes al Género *Bifidobacterium* en caries dental y placa dental humana tomada de superficies dentales libres de caries. Las tres especies aisladas fueron *B.dentium*, *S. inopinata* (*B.inopinatum*) y *P. denticolens* (*B.denticolens*), las cuales estuvieron presentes en 13 de 19, y 11 de 15, muestras de caries dental y placa dental, respectivamente. *S.inopinata* fue la especie más frecuentemente aislada de caries dental, mientras

que *B.dentium* fue la más numerosa en placa dental, mientras que, la prevalencia de *P.denticolens* fue similar en ambos hábitats. En este estudio queda en evidencia que este Género forma parte de la microflora residente de la cavidad bucal (Modesto *et.al.*, 2006).

Veillonella

Son diplococos Gram negativos, anaerobios estrictos, inmóviles que conforman parte de la flora residente en cavidad bucal y vías respiratorias altas. La colonización primaria de *Veillonella* es independiente de la presencia de dientes erupcionados. A pesar de que *Veillonella* ofrece una pobre adherencia directa a los tejidos del hospedero de la cavidad bucal, su presencia en grandes cantidades en placa dental subgingival, placa dental supragingival y sobre superficies mucosas bucales, se debe a mecanismos de coagregación interbacteriana (Könönen *et.al.*, 1999; Mc Bried *et.al.*, 1981; Moore *et.al.*, 1985; Liljemark *et.al.*, 1971; Hughes *et.al.*, 1988).

La importancia de su presencia en los ecosistemas bucales, está relacionada con el mantenimiento de la homeostasis y la capacidad que posean de neutralizar los ácidos producidos por los microorganismos cariogénicos. *Veillonella* no metaboliza los hidratos de carbono, pero si metaboliza el ácido láctico producido por otras bacterias para formar ácido propiónico y ácido acético, ambos ácidos son más débiles que el ácido láctico (Gutierrez *et.al.*, 2005; Delwiche *et.al.*, 1985).

Estudios microbiológicos, morfológicos e inmunológicos, han demostrado que la colonización de la superficie dentaria por parte de bacterias patógenas se acompaña siempre en sus estadios iniciales y en todas las formas de progresión, de mecanismos de defensa humorales y celulares del organismo. Lo que va a desencadenar el desarrollo de afecciones sobre los tejidos duros del diente, ocasionando un proceso carioso, lo cual significa, que la placa acidogena desmineraliza más esmalte, el cual se puede remineralizar mediante los procesos de remineralización. La caries es un proceso destructivo crónico y en su estadio inicial tienen su origen formas irreversibles, ya que no pueden experimentar ninguna remoción.

La caries se inicia con una desmineralización solo visible microscópicamente de la superficie del esmalte o del cemento afectado. En fases más avanzadas, el esmalte adquiere el aspecto de la tiza y finalmente ocurre la invasión de la superficie.

Langelan y cols., en 1973, demostraron que con el paso de la caries del esmalte a la dentina se producen las primeras reacciones inflamatorias de la pulpa. Histológicamente encontramos granulocitos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos en la capa de odontoblastos. Los procesos odontoblasticos acaban en una capa de dentina esclerosada, donde normalmente, primero se formó dentina peritubular y a continuación se produjo la mineralización de los procesos odontoblásticos (Voeguel, 1980); con el avance de los procesos cariosos a través de los demás tejidos, en la zona más profunda, se produce la destrucción de la capa de

odontoblastos, el plexo capilar es poco denso y a menudo solo se observan algunos fragmentos vasculares (Seinige, 1979). Las enzimas liberadas de los granulocitos y los macrófagos destruidos provocan la necrosis de las células del endotelio, lo que da lugar a elevada permeabilidad vascular y un edema extracelular (Tornek, 1981).

La inflamación se va extendiendo paulatinamente, las mineralizaciones patológicas a lo largo de la pared de los conductos y las primeras formaciones de dentículos, aparecen como cambios adicionales (Langeland, 1981; Gängler, 1986).

Si se lleva a cabo un tratamiento conservador de la caries en este estadio evolutivo de la enfermedad, cuando la inflamación del tejido pulpar es reversible, los cambios dentro de la pulpa pueden quedar como tejido cicatrizal (Beer, 1992).

De no haber una intervención por parte del clínico y permitir el avance de la afección cariosa, las bacterias se introducen en los tubulillos dentinarios, los granulocitos y neutrófilos se desplazan en dirección a las entradas de aquéllos limitadas, por la pulpa, se descomponen y liberan entonces, enzimas lisosomales, con destrucción tisular subsiguiente y atracción quimiotáctica de mas células inflamatorias (Wright, 1982).

Las sustancias reactivas que aumentan más la inflamación, son las bacterias y sus productos de metabolismos, desecho y por último, se da la descomposición de la dentina afectada. En este punto se establece un círculo vicioso y se desarrolla una

pulpitis irreversible (Langeland, 1981). En la periferia de la zona necrótica, la pulpa contiene granulocitos y neutrófilos que fagocitan bacterias. De esa forma, se licua todo el tejido pulpar, con lo cual, este proceso se extiende en sentido apical (Lin *et. al.*, 1984). Ocurrido lo anterior las bacterias siguen avanzando a través de todo el sistema de conductos radiculares ocasionando la formación de un absceso local con reabsorciones de hueso, cemento y dentina (Fig. 4) (Rudolf *et.al.*, 1998).



Figura 4. Presencia de una lesión periapical ocasionado por una pulpopatia.

Tomada de

[http://imaging.consult.com/image/chapter/Musculoskeletal?title=Dental%20Imaging
&image=fig58&locator=gr58a&pii=S1933-0332\(07\)76002-0](http://imaging.consult.com/image/chapter/Musculoskeletal?title=Dental%20Imaging&image=fig58&locator=gr58a&pii=S1933-0332(07)76002-0)

Factores que afectan a la colonización bacteriana.

Puerta de entrada y dosis infecciosa.

El número de bacterias que colonizan la pulpa dental será mayor, según aumente el tamaño de la puerta de entrada a la infección. Este hecho está unido al factor de tiempo de exposición en la superficie y los factores intrínsecos al tipo bacteriano que permite su adhesión a la superficie, lo cual determinará, la activación de factores que permitan la respuesta inflamatoria (Ureña, 1995).

Adherencia y proliferación local.

Las características morfoestructurales de la cámara pulpar y de los conductos radiculares, al encontrarse las bacterias protegidas frente a los mecanismos de arrastre y frente a la acción del sistema inmunitario, debido al compromiso vascular que sufre el tejido pulpar, ofrecen unas condiciones ideales para la adhesión y proliferación bacteriana (Ureña, 1995).

Factores que afectan a la capacidad de producir daño tisular.

Las alteraciones ocasionadas en el tejido pulpar son el resultado de la acción lesiva de exotoxinas, endotoxinas, enzimas y metabolitos, entre otros. Un buen número de bacterias involucradas en los procesos pulpares y periapicales poseen estos elementos de virulencia; es el caso de diversas especies de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptoestreptococcus* (Ureña, 1995).

Takehashi y cols. en 1995, establecieron una relación causa-efecto entre ciertos microorganismos y la infección pulpar. Realizaron un experimento con ratas geobióticas, en el cual expusieron el tejido pulpar del diente y observaron que a consecuencia de ello se producía una discreta inflamación y en las muestras que se encontraban en un medio no estéril presentaban una necrosis pulpar.

Hasta la década de 1979 la mayoría de los autores citaban a los *Streptococcus* del grupo *viridans* como la especie más prevalente en los conductos pulpares, seguidos de *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus aureus*.

Byström y cols. en 1981, informaron que las especies más prevalentes pertenecían a los géneros *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Peptoestreptococcus* y que eran anaerobios más del 90% de las cepas aisladas.

Para determinar qué tipos de bacterias se encuentran dentro de las diversas pulpopatías desencadenantes de una necrosis del tejido neurovascular del órgano dentario, o que se encuentran en tejidos necrosados, es necesario realizar un diagnóstico microbiológico.

Diagnóstico microbiológico en endodoncia.

El diagnóstico microbiológico es un tema que ha suscitado un amplio debate desde la década de 1950. La información que aporta permite:

- a) Identificar el agente o agentes etiológicos implicados en la infección pulpar.

- b) Determinar el grado de esterilidad del conducto radicular previo a la obturación del conducto radicular.

Métodos de diagnóstico microbiológico utilizados en endodoncia

Los métodos utilizados en endodoncia para determinar la presencia de bacterias en los conductos radiculares básicamente son dos: examen directo y cultivo.

Examen directo.

Se realiza extendiendo la muestra sobre un portaobjetos, procediendo posteriormente a su fijación y tinción, mediante distintas técnicas, siendo más utilizada la de Gram. No obstante, la información aportada es escasa, pues tan solo permite comprobar si la muestra que se ha obtenido está o no contaminada (Ureña, 1995).

Cultivo.

Las indicaciones para realizarlo serían:

- a) Pacientes con procesos endodónticos resistentes al tratamiento convencional.

- b) Pacientes inmunodeprimidos, con el objeto de identificar y tratar focos primarios de infección.

Método de recolección de la muestra del conducto radicular para realizar el cultivo microbiológico.

Una vez que se ha seleccionado el medio de transporte idóneo, es necesario asegurarse de que no se encuentra contaminada la muestra. Para ello se aislará el campo operatorio mediante un dique de goma. Los conductos radiculares deben estar preparados y se descontaminarán con peróxido de hidrógeno al 30 % o 35 % antes de la toma de la muestra. Un minuto después de esta descontaminación se irriga con solución fisiológica. A continuación utilizando una pinza estéril, se toman puntas de papel estériles y se introducen en el conducto radicular, procurando que la punta de papel no se contamine al contactar con la corona del diente, el dique de goma o cualquier otra estructura. La punta de papel tiene que llegar al tercio apical del conducto radicular y se mantiene durante un minuto en este lugar, para posteriormente retirarla e introducirla en el medio de transporte. Se tomarán dos puntas de papel por conducto radicular. El transporte y siembra se realizará lo más rápidamente posible para garantizar la viabilidad de la microbiota presente en la muestra.

Procesamiento de la muestra.

Dado el amplio número de especies que pueden aislarse, el procesamiento de la muestra no está exento de problemas (Ureña, 1995).

Dificultades en los cultivos microbiológicos.

Durante muchos años se han empleado técnicas microbiológicas para la identificación de los microorganismos presentes en el interior de los conductos radiculares, una vez que el paquete neurovascular ha desarrollado alguna patología, consecuente a una invasión bacteriana, estas técnicas resultan de mucha ayuda; pero presentan bastantes contratiempos y problemas de procedimiento.

No todos los microorganismos pueden crecer y mantenerse en condiciones artificiales de laboratorio. Existen varios casos de sistemas microbianos que mediante procesos microbiológicos se creía que tenían ciertas características; pero, al emplear técnicas de biología molecular se descubrió que las características de esos sistemas microbianos eran distintas (Amann *et. al.*, 1995).

Las investigaciones de muchos medios acuáticos y terrestres utilizando técnicas microbiológicas han demostrado que los métodos cultivables de estas especies representan menos del 1% de la población existente (Ward *et. al.*, 1990; Amann *et. al.*, 1995).

Hay muchas razones que provocan que sean incultivables algunos tipos de microorganismos (Siqueira *et. al.*, 2005) tales como:

1. Falta de nutrientes esenciales o factores de crecimiento en el medio de cultivo artificial.
2. Condiciones de sobrealimentación.
3. La toxicidad del medio de cultivo en sí, que puede inhibir el crecimiento bacteriano.
4. La producción de sustancias inhibidoras del microorganismo ocasionado por otras especies presentes en un consorcio mixto.
5. La dependencia metabólica de otros microorganismos.
6. La interrupción de algunos sistemas de comunicación entre algunas bacterias al separar o aislar la bacteria para su cultivación.
7. Condiciones para su conservación.

Pese a las necesidades de tener mejores medios para determinar la existencia de las bacterias en el interior de los conductos y determinar si realmente están presentes, existe la necesidad de buscar y desarrollar nuevos métodos para realizarlo. Desde hace ya algunos años se ha implementado el uso de la biología molecular para llevar a cabo esta tarea, misma que nos ha demostrado ser bastante funcional y ha arrojado datos más exactos y confiables.

Los métodos inmunológicos emplean anticuerpos específicos que reconocen antígenos microbianos para detectar directamente las especies objetivo. Los anticuerpos dirigidos hospedan inmunoglobulinas específicas de alguna especie para realizar pruebas de detección indirecta. La reacción puede ser visualizada utilizando una variedad de técnicas y reacciones, incluyendo la inmunofluorescencia directa e indirecta, citometría de flujo y una técnica de ligado a enzimas. Estos métodos pueden requerir el uso de anticuerpos mononucleados para asegurar una alta especificidad.

El desarrollo de técnicas de biología molecular para la investigación de las comunidades microbianas ha proporcionado una amplia gama de técnicas nuevas para el estudio de la microbiota en el ser humano, en la salud y enfermedad. En este sentido existió una contribución significativa de métodos biológicos moleculares para la identificación de lo que hasta en ese entonces era desconocido en cuanto a patógenos humanos. En este sentido ha habido una significativa contribución en cuanto a la identificación de nuevos patógenos (Anderson *et. al.*, 1991; Relman, 1997).

Estructuras de comunidades microbianas pueden ser analizadas mediante técnicas de huellas digitales, tales como la electroforesis en un gel gradiente desnaturizante, fragmentos terminales de polimorfismo de longitud. La hibridación fluorescente *insitu* puede medir gran cantidad de especies y

proporcionar información específica sobre su distribución sobre los tejidos. Entre otras aplicaciones del DNA-DNA tenemos las matrices de hibridación, especies específicas de PCR, PCR múltiple y la PCR en tiempo real se pueden utilizar para la exanimación de un gran número de muestras clínicas determinando la presencia de especies objetivo.

El método de PCR está basado en la replicación *in vitro* de ADN a través de ciclos repetitivos, de desnaturalización, hibridación y extensión realizados en dispositivos automatizados llamados termocicladores.

Por estas y algunas otras causas es que se aconseja el empleo de este tipo de pruebas para realizar detecciones microbiológicas, lo cual arrojará resultados que al ser aplicados a la clínica pueden darnos herramientas para mejorar nuestro tratamiento.

La introducción de la biología molecular nos ha ayudado para el reconocimiento bacteriano dentro de las enfermedades pulpares y periapicales, lo cual nos va a dar resultados más confiables y exactos (Cohen, 2002).

Las lesiones pulpares consecuentes de una contaminación bacteriana al conducto radicular y su paquete neurovascular, nos van a conducir con frecuencia, a procesos inflamatorios irreversibles, que avanzan desde la isquemia, hasta el infarto, la necrosis, y en último término, la extensión perirradicular de la enfermedad. Este fenómeno se origina en un espacio con infinitas variaciones anatómicas y complejidades en toda su longitud (Cohen 2002).

Para todo clínico, es importante erradicar en lo posible la carga bacteriana que encontramos en el interior del conducto cuando hay presencia de las mismas, buscando mejorar las condiciones de éste y evitar que la afección consecuente a la invasión bacteriana siga avanzando. Este procedimiento de limpieza del interior de los conductos es llevado a cabo mediante el procedimiento de la endodoncia, el cual consiste en una limpieza químico-mecánica del sistema de conductos radiculares, además de la preparación y conformación de los mismos para recibir un material de obturación (Cohen, 2002).

La terapia endodóntica cuenta con varias fases o etapas para su realización, de las cuales, no podemos prescindir de ninguna de ellas para lograr nuestro objetivo final. Dentro del pre tratamiento, debemos realizar un análisis detallado de la pieza u órgano problema para crear nuestro plan de trabajo; las preparaciones de accesos son elementos esenciales para el éxito endodóntico. La preparación de acceso de una cavidad bien diseñada es el primer paso crítico en la serie de procedimientos que conducen a la obturación tridimensional del conducto radicular. Debemos realizar un remodelado radicular, lo cual, nos va a facilitar la limpieza, mismo que va acompañado en todo momento por un agente irrigante, que además de tener la función de lubricar el conducto, nos va a ayudar a la desinfección y eliminación de la carga bacteriana existente en el interior del conducto, con la remodelación del canal radicular debemos eliminar la dentina restrictiva, permitiéndonos, que un mayor volumen de irrigante pase de manera efectiva al interior del conducto. Tiene importancia saber que las limas le dan la

forma al conducto, pero es esencial comprender que las soluciones de irrigación son las que limpian el conducto radicular (Cohen, 2002).

Como agente irrigante el NaOCl es aún el más utilizado en la endodoncia moderna por sus propiedades antibacterianas, lubricantes, y las de agente disolvente de tejido (Fig. 5) (Piskin *et.al.*, 1995).



Figura 5.Hipoclorito de sodio uso endodóntico.

Tomado de <http://www.dentalartigas.com.ar/artigas,%20medicamento.htm>

El hipoclorito de sodio es una sal formada de la unión de dos compuestos químicos, el ácido hipocloroso y el hidróxido de sodio, que presenta como características principales sus propiedades oxidantes. El hipoclorito de sodio es hipertónico (2800mOsmol/Kg) y muy alcalino (pH= 11.5 a 11.7).

La actividad solvente, y las propiedades antimicrobianas son debidas primariamente a: (Johnson *et. al.*, 1993)

- a) La habilidad del hipoclorito de sodio de oxidar e hidrolizar las proteínas celulares.
- b) La liberación de cloro, para formar ácido hipocloroso.
- c) A largo plazo, su habilidad osmótica de extraer líquidos fuera de las células.

El NaOCl ejerce su acción antibacteriana por medio del contacto directo con los microorganismos o por vaporización. No se ha demostrado experimentalmente cómo destruye exactamente al microorganismo, pero la eficacia en la desinfección depende de la concentración del ácido hipocloroso (HClO) no dissociado en solución. El HClO ejerce su efecto germicida por medio de una acción oxidativa en el grupo sulfidril de las enzimas de las bacterias, estas enzimas esenciales son inhibidas y posteriormente se va a presentar un rompimiento de las reacciones metabólicas, dando como resultado la muerte celular de las bacterias (Vianna, 2001). Una característica del NaOCl es que tiene un pH de aproximadamente 10 – 12, por su pH alcalino, neutraliza la acidez del medio evitando el desarrollo bacteriano (Hauman, 2003).

MECANISMO DE ACCIÓN.

Su uso en clínica es generalizado en concentraciones que van desde 0.5% hasta el 5.25%. El proceso químico por el cual el NaOCl realiza su acción antimicrobiana

ocurre cuando entra en contacto con las proteínas tisulares, haciendo que se formen hidrógeno, formaldehído y acetaldehído. Las cadenas peptídicas se rompen para disolver las proteínas; en este proceso el hidrógeno es sustituido por el cloro con formación de cloramina, que interviene directamente como antimicrobiano, ya que interfiere en la acción oxidativa celular con inactivación enzimática irreversible en la degradación de lípidos y ácidos grasos; de este modo se disuelve el tejido necrótico y el NaOCl penetra y limpia mejor las áreas infectadas (Drake *et. al.*, 1994).

Grossman, Meiman en 1941, reportaron el efecto positivo de la solución de hipoclorito de sodio sobre la disolución de tejido pulpar remanente: al dejar una pulpa recién extraída en un vaso dappen lleno con esta solución al 5.25%, fue posible observar su disolución al cabo de 20 a 30 minutos. (Cohen, 1999; Seltzer, 1988).

La eficacia en la disolución de tejidos del hipoclorito de sodio se ve influenciada por la integridad estructural de los componentes del tejido conjuntivo de la pulpa, de manera que si la pulpa está descompuesta, los restos tisulares se disuelven rápidamente, mientras que si la pulpa está vital y hay poca degradación estructural, el hipoclorito necesita más tiempo para disolver este tejido (Cohen, 1999).

Esta propiedad de disolución de tejidos es particularmente importante en aquellas zonas del conducto que quedan sin instrumentar. Un estudio mediante el MEB ha demostrado que el NaOCl actúa disolviendo tejido orgánico (pre dentina), observándose claramente los calcosferitos, pues son áreas a las que no llegó la instrumentación mecánica, pero que sí fueron alcanzadas por el agente irrigante (Mader, 1984).

Efecto antibacterial

El efecto antibacterial del hipoclorito de sodio se debe a la formación de ácido hipocloroso, una vez que la sustancia entra en contacto con el tejido orgánico. El ácido hipocloroso ejerce su efecto por oxidación irreversible e hidrólisis de los grupos sulfhidrilos de enzimas bacterianas esenciales, lo que provoca disrupción de importantes reacciones metabólicas y genera la muerte de la bacteria por salida del fluido intracelular (ósmosis), dada la hipertonicidad de la solución (Hauman, 2003; Estrela C. *et. al.*, 2002).

Igualmente, se ha demostrado que el pH alcalino del hipoclorito de sodio neutraliza la acidez del medio y por lo tanto crea un ambiente inadecuado para el desarrollo bacteriano (Love, 2003; Hülsmanm, 2000), contrario a esto algunos

autores consideran que esta propiedad añade un componente tóxico a la solución (Cohen, 1999).

El alto pH del NaOCl tiene relevancia en la eficacia antimicrobiana de éste, pues ocasiona peroxidación lipídica y daño a la membrana celular bacteriana (degradando los fosfolípidos de membrana), la cual ejerce roles esenciales en el metabolismo, transporte de iones, crecimiento y división celular, resultando en daño estructural y funcional de los microorganismos (Estrela *et. al.*, 2002).

El hipoclorito de sodio reacciona con los residuos orgánicos en el conducto radicular y de esta forma facilita su limpieza, pero se ha podido observar que éste contacto “consume” el cloro disponible, lo cual va inactivando químicamente al NaOCl y reduce entonces su capacidad antibacteriana. De ahí que la irrigación debe ser profusa para permitir un recambio constante, esto es, una solución fresca de NaOCl debe ser aplicada frecuentemente dentro del conducto radicular para reactivar la reacción química y la remoción de los detritos (Marini, 1996).

Las concentraciones clínicas disponibles varían entre el 0,5% al 12%, pero a medida que la dilución del hipoclorito de sodio es mayor, disminuye de manera significativa la propiedad antibacteriana, la propiedad de disolución del tejido y la

propiedad de debridamiento del conducto, al igual que disminuye su toxicidad (Siqueira *et. al.*, 2000).

Al aplicar calor al hipoclorito de sodio, se produce un aumento del desplazamiento molecular, por lo que las moléculas contactarán más rápido y se producirá la desintegración del tejido sobre el que actúa en un tiempo menor; además la elevación térmica produce una disminución de la tensión superficial, favoreciendo la penetración del NaOCl hacia los túbulos dentinarios y diversas irregularidades del sistema de conducto. Este aumento de la temperatura tiene un efecto positivo sobre la acción disolvente del NaOCl: temperaturas de 35,5°C provocan el aumento del poder de disolución sobre los tejidos necróticos mientras que en los tejidos vitales este efecto se obtiene a 60°C y 5,25% de concentración (D'Arcangelo *et. al.*, 1999; Joseph, 1980; Balekjian, 1980). Esto puede tener relación con el incremento en la cantidad de cloro disponible que genera la elevación térmica (Zehnder *et. al.*, 2006; Joseph, 1980).

El aplicar calor al hipoclorito para mejorar su efectividad al momento de utilizarlo como agente irrigador, se puede llevar a cabo mediante la aplicación de fuerzas ultrasónicas.

El uso de ultrasonido en endodoncia, se basa en los distintos fenómenos que se producen durante la aplicación de éste dentro del conducto radicular. Estos

fenómenos: oscilación, cavitación, microcorriente acústica y generación de calor, van a producir efectos sobre las estructuras dentarias, especialmente sobre la dentina y la capa de barrillo dentinario, así como la potenciación de efectos antimicrobianos al utilizarse en combinación con soluciones irrigantes.

El uso del ultrasonido en la terapéutica endodóntica abarca desde la eliminación de restauraciones para acceder al sistema de conductos, eliminación de obstrucciones como instrumentos fracturados y calcificaciones, la preparación biomecánica, irrigación ultrasónica y obturación del sistema de conductos, así como en la cirugía endodóntica (Padrón, 1998).

Las propiedades del ultrasonido que presentan interés en el campo de la endodoncia son: la producción de movimiento oscilatorio del instrumento, la cavitación, la microcorriente acústica y la generación de calor, así como, la combinación de estas propiedades con la irrigación, generan un efecto sinérgico que potencia la acción biológica del irrigante dentro del conducto.

Finalmente dentro de las fases o etapas de la endodoncia tenemos la obturación, por medio de la cual logramos un sellado, el cual debe ser tridimensional y lo más hermético posible para evitar que ingresen nuevamente bacterias al interior del conducto. Para facilitar la obturación del sistema de conductos debemos tener una buena conformación radicular, lo que permite una mejor y más adecuada

condensación del material de obturación en el interior de los canales radiculares (Cohen, 2002).

Los objetivos en la endodoncia se pueden dividir en biológico y mecánico (Cohen, 2002).

El objetivo biológico de los procedimientos de limpieza y remodelación consiste en eliminar todo el tejido pulpar, bacterias y sus endotoxinas del conducto radicular.

El objetivo mecánico consiste en hacer posible la obtención del objetivo biológico y ampliar el conducto lo suficiente para permitir su obturación tridimensional.

¿Es posible limpiar completamente un conducto?

Dentro del objetivo mecánico, la conservación de la anatomía del conducto radicular original, es importante por lo que debemos eliminar la cantidad de dentina necesaria para asegurar la limpieza, pero, conservando el máximo posible de dentina residual y así, mantener la porción del foramen apical realizando un ensanchamiento cuidadoso y mínimo del agujero apical sin perder o modificar su posición (Cohen, 2002).

Los conductos ensanchados aceptan un mayor volumen de solución irrigadora potencializando la limpieza, favoreciendo la eliminación del barrillo dentinario,

eliminación de una mayor parte de tejido pulpar, bacterias y endotoxinas (Cohen, 2002).

El objetivo más importante de la terapia de conductos radiculares es minimizar el número de microorganismos y debris patológico.

Grossman describe la limpieza mecánica como la parte más importante de la terapia de conductos radiculares (Grossman, 1970).

Schilder en 1974 menciona que la limpieza y el limado son fundamentales para el éxito del tratamiento en la terapia de conductos.

Los objetivos mecánicos de la limpieza y el remodelado son la eliminación de dentina restrictiva, el esculpido de una preparación cuidadosamente limpia y preparada para la obturación en tres dimensiones.

La obtención de los objetivos mecánicos de la limpieza y el remodelado consigue también el objetivo biológico y favorece un éxito predecible (Cohen, 2002).

La instrumentación mecánica e irrigación son componentes fundamentales y esenciales para el éxito del tratamiento de conductos. La investigación nos ha demostrado que la instrumentación mecánica elimina en gran manera el número de microorganismos remanentes en el sistema de conductos radiculares (Reig *et.al.*, 1952; Haga, 1966).

Los objetivos microbiológicos finales de la preparación químico-mecánica son erradicar por completo las poblaciones bacterianas del interior del conducto o por

lo menos reducir en lo posible la carga bacteriana, permitiendo que los remanentes bacterianos posteriores a la instrumentación sean compatibles con la cicatrización del tejido perirradicular (Siqueira, 2000).

Las bacterias persistentes posteriores a la limpieza y conformación químico-mecánica del interior del conducto a niveles detectables por medios moleculares pueden influir de manera negativa en el éxito del tratamiento endodóntico (Sundqvist *et. al.*, 1998; Sjögren *et. al.*, 1997).

La manufactura y desarrollo de sistemas de instrumentos rotatorios Ni – Ti para facilitar la limpieza y conformación del conducto radicular se ha vuelto muy popular debido a que en apariencia es más fácil y se reduce el número de instrumentos a utilizar. De cualquier manera, han notado que el énfasis tan fuerte en reducir el número de instrumentos y limite apical de la preparación a diámetros pequeños no produce una limpieza en esta zona, en dientes con alguna patología (Spangberg *et. al.*, 2001).

La capacidad de conformación de los instrumentos en los conductos radiculares se determina por una compleja serie de parámetros, tales como, la sección transversal del instrumento y su capacidad para eliminar residuos y la capa de debris dentinario (Paranipe *et. al.*, 2012).

Investigadores han realizado estudios con el fin de detectar algunos de los microorganismos causantes de los fracasos endodónticos.

Siqueira y Rocas en el 2005, hicieron una recopilación de estudios que evalúan la microbiota presente en infecciones endodónticas primarias, encontrando especies de microorganismos como *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Tanerella forsythia*, entre otros, fueron los que se encontraron en mayor porcentaje en las infecciones endodónticas primarias. Cepas de *E. faecalis* también fueron observadas en dichos estudios. Los porcentajes de prevalencia varían desde 30% aproximadamente en infecciones endodónticas asociadas con lesiones perirradiculares asintomáticas, hasta 5% aproximadamente en infecciones endodónticas asociadas con periodontitis apical aguda.

El *Enterococcus faecalis* es un microorganismo comúnmente detectado en infecciones endodóntica asintomáticas y persistentes. Su prevalencia en este tipo de infecciones oscila entre un 24% a un 77%. Este hallazgo se puede explicar por varios factores de supervivencia y virulencia con que cuenta la bacteria, incluyendo su capacidad para competir con otros microorganismos, invadir tubulillos dentinarios y su capacidad de subsistir a la privación nutricional, además de que pueden formar biopelículas. El uso de una adecuada técnica aséptica, el incremento en los diámetros de preparación y la inclusión de clorhexidina en combinación con hipoclorito de sodio como materiales de irrigación, son los métodos más eficientes actualmente para luchar contra la cepa de *E. faecalis* dentro del sistema de conductos radiculares de los órganos dentarios.

E. faecalis es un coco Gram-positivo que puede aparecer solo, en pares o en cadenas; es un microorganismo anaerobio facultativo y su crecimiento óptimo ocurre a 35°C; sin embargo, también se ha observado crecimiento entre 10 y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en caldos que contengan cloruro de sodio al 6,5% y esculina hidrolizada en presencia de sales biliares al 40% (Portenier *et. al.*, 2003; Facklam *et. al.*, 1999).

Los *E. faecalis* son anaerobios facultativos, que poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno (Fig. 6) (Gilmore, 2002; Rocas *et. al.*, 2004).

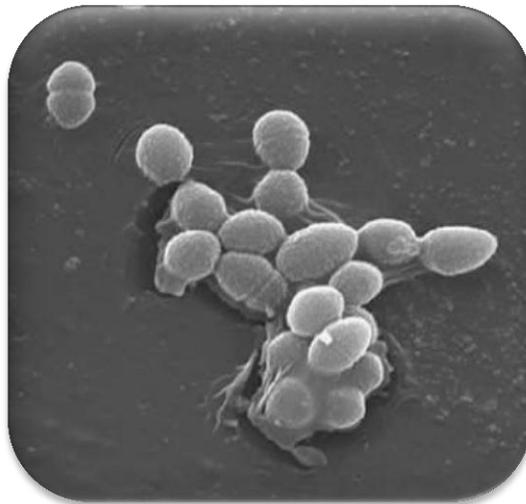


Figura6. *Enterococcus faecalis*.

Tomada de http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis

Las especies de *Enterococcus* viven en grandes cantidades (10⁵ – 10⁸ unidades de colonias formadoras por gramo de heces) en el lumen intestinal y en la mayoría de los casos no causan ningún daño a sus anfitriones. También están presentes en los tractos genitales masculinos y femeninos, también en la cavidad oral en menor número (Koch *et. al.*, 2004).

Ellos catabolizan una gran cantidad de fuentes de energía incluyendo carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y muchos cetoácidos. Los *Enterococcus* sobreviven en ambientes muy agresivos, incluyendo un pH extremadamente alcalino también a elevadas concentraciones de sal. Resisten a las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, ácido y a la desecación. Ellos pueden crecer entre 10°C a 45°C y sobrevivir a una temperatura de 60°C durante 30 minutos (Gilmore2002; Tendolkaret. *al.*, 2003).

McHughycols. en 2004, realizan un estudio donde se evaluaron el pH necesario para inhibir el crecimiento del *E. faecalis* y el experimento in vitro demostró que se necesita un pH mayor de 11,0 para la erradicación de este microorganismo. Estos autores refieren que el hidróxido de calcio como medicación intraconducto puede alcanzar un pH crítico dentro del conducto radicular (Mchughc, *et. al.*, 2004).

Otra propiedad que le confiere resistencia al *E. faecalis* es su capacidad de formar biopelículas y así, poder sobrevivir a ciertas medicaciones intraconducto y a diversos protocolos de irrigación.

Hasta este momento hay 23 especies de *E. faecalis* y estas se dividen en cinco grupos en función de su interacción con el manitol, sorbosa y arginina (Tabla 1) (Teixeira *et. al.*, 2003).

Grupo	Especie
<p>Grupo I</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. ayium.</i></p> <p><i>E. gilvus.</i></p> <p><i>E. malodoratus.</i></p> <p><i>E. pallens.</i></p> <p><i>E. pseudoavium.</i></p> <p><i>E. raffinosus.</i></p> <p><i>E. saccharolyticus.</i></p>
<p>Grupo II</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. faecalis.</i></p> <p><i>E. faecium.</i></p> <p><i>E. casseliflavus.</i></p> <p><i>E. gallinarum.</i></p> <p><i>E. mundt.</i></p> <p><i>Lactococcus.</i></p>
<p>Grupo III</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. dispar.</i></p> <p><i>E. durans.</i></p> <p><i>E. hiare.</i></p> <p><i>E. porcinus (E. villorum).</i></p> <p><i>E. rattl.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. asini.</i></p> <p><i>E. cecorum.</i></p> <p><i>E. sulfureus.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. columbae.</i></p> <p><i>Vagococcus sp.</i></p>

Tabla 1 Categorización de las especies de Enterococcus.

Tomada de Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment.

El *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico glicerol intracelular asociado con la membrana citoplasmática. La pared celular está constituida por una gran cantidad de peptidoglicanos y ácido teicoico (Portenier *et. al.*, 2003).

Nakajo y cols. en 2006, en este mismo sentido, evaluaron las propiedades bioquímicas del *E. faecalis* que le confieren la resistencia ácido-alcalina, comparándola con la de *Streptococcus mutans*. *E. faecalis* mostró ácido-resistencia similar a *S. mutans* y una mayor alcalino-resistencia. Estos autores sugieren que la resistencia al pH de *E. faecalis* se puede atribuir a la resistencia de la membrana citoplasmática frente a medios ácidos o alcalinos junto con el sistema de transporte de protones vinculado al ATP. Junto con la propiedad de sobrevivir a medios ambientes con pH ácidos o alcalinos, *E. faecalis* ha demostrado también ser capaz de formar comunidades microbianas adheridas a superficies o biopelículas (Fig. 7).

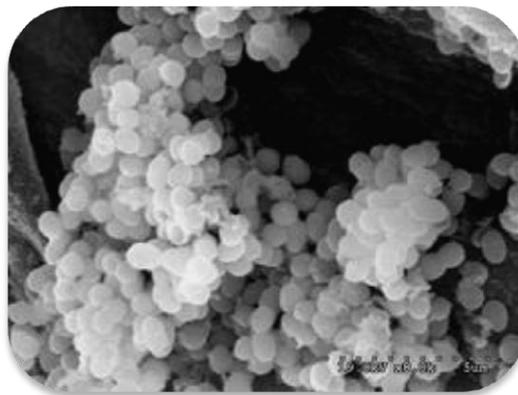


Figura 7. Biopelícula formada por *E. faecalis*.

Tomada de <http://kimberlyklinelab.com/research/index.html>

En base a lo anteriormente mencionado, referente a la contaminación bacteriana de los conductos radiculares y a la resistencia de algunas cepas bacterianas ante medios adversos, y en este caso en particular, refiriéndonos al *Enterococcus faecalis* es necesario realizar un tratamiento endodóntico y acompañarlo con un agente irrigante, para así poder eliminar en lo posible la mayor cantidad de bacterias del interior de los conductos radiculares y obtener una mayor probabilidad de éxito en nuestro tratamiento (Cohen, 2002).

Justificación

De acuerdo a la metodología sugerida, el pronóstico favorable del tratamiento endodóntico, depende de la eliminación de tejido pulpar inflamado o necrótico, bacterias y todo agente potencialmente irritante. Sin embargo, con la preparación, sólo se logra una reducción importante de agentes contaminantes. Determinar el diámetro final de la preparación, es un concepto que genera controversia. El respeto a la anatomía del tercio apical del conducto es principio de muchos clínicos, por lo que limitan la preparación apical tanto en longitud, como en diámetro, si bien esta acción respeta la anatomía, no es efectiva en la calidad de la limpieza, estudios sugieren que las bacterias penetran 250 a 350 micras hacia las paredes dentinarias. Es sabido que el trabajo a diámetros pequeños, respeta la anatomía del tercio apical, también mantiene respeto a las bacterias que se han establecido en los túbulos dentinarios, por lo que ensanchar a un mayor diámetro se ve necesario para eliminar estas bacterias.

Objetivos Generales.

- Establecer, en base a la los textos analizados, la metodología más adecuada para comparar *in vitro* el efecto de dos diámetros de preparación, sobre la reducción de colonias bacterianas.

Objetivos Específicos.

- Proponerla metodología más eficaz para comparar dos diámetros de terminación apical 35 o 45 y observar en cual existió una mayor reducción en la población de colonias bacterianas.
- Determinar la metodología más adecuada para analizar los diámetros finales de preparación apical, para observar en cuál de los dos existe una mayor recolonización bacteriana.

Hipótesis

- En base a la metodología sugerida, se podrá determinar si a mayor diámetro de preparación apical, mayor cantidad de bacterias eliminadas dentro del conducto radicular y por ende una mejor limpieza y desinfección del conducto.
- Los resultados que arroje la metodología propuesta, nos podrán orientar si la tasa de éxito y un mejor pronóstico serán obtenidos a mayores diámetros de terminación apical.

Hipótesis Nula:

- Los resultados obtenidos de la metodología propuesta no arrojaran cambios significativos en el conteo de colonias bacterianas entre cada grupo incluido en el estudio.

Materiales y Métodos.

Tomando en cuenta los estudios analizados en algunas revistas como el JOE, Community Dent Oral Epidemiol, J Clin Microbiol, Endodontic Topics, entre algunas otras, se observó que el *E. Faecalis* ha sido aislado muy frecuentemente en infecciones endodónticas persistentes, además, de que esta cepa gracias a su capacidad adaptativa y a algunos factores de virulencia, es muy resistente y difícil de eliminar del interior del conducto, como lo demostró en su estudio enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. El Hipoclorito de Sodio, en la actualidad sigue siendo el irrigante más utilizado dentro de los tratamientos endodónticos, gracias a sus propiedades químicas como lo son un pH muy bajo, su capacidad para desintegrar tejidos, su capacidad de lubricación, además de que por su consistencia física, también tiene un efecto mecánico de barrido al ser bombeado en el interior del conducto, lo anteriormente descrito del Hipoclorito de Sodio se menciona en el artículo Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Se ha demostrado que al aplicar fuerzas ultrasónicas al Hipoclorito de sodio, con el fin de mejorar la efectividad de este, va a incrementar la desinfección del sistema de conductos radiculares, gracias a la cavitación y la microcorriente acústica, logrando así una mayor remoción de detritus y de la capa de desecho dentinario de la superficie del conducto, así como también, logra potencializar la acción biológica del irrigante, causado por un incremento en la temperatura como lo demostró Baumgartner J; Cuenin P; 1992. Siqueira J. y cols. 2000, mencionan que un incremento en el diámetro de preparación apical facilita la remoción de tejido pulpar necrótico y las bacterias que se encuentren en los tejidos duros del interior del conducto además de aquellas que se encuentren alojadas en los tubulillos. Se ha demostrado que la PCR (reacción en cadena polimerasa) en tiempo real nos permitirá obtener una cuantificación bacteriana pre y pos instrumentación, siendo esta más exacta que la microbiología, según lo citado en el artículo Emerging infections and newly-recognised pathogens.

RESULTADOS

Obtención, almacenamiento y lavado de las piezas dentarias.

Las piezas dentarias de reciente extracción serán lavadas bajo el chorro de agua, y los restos de tejido se removerá con una hoja de bisturí para posteriormente ser colocadas en hipoclorito de sodio al 5.25% durante 5 min para su posterior almacenamiento en agua con formalina al 2.5%.



Figura 8. Limpieza bajo el chorro de agua del órgano dentario a incluir dentro del estudio. Fotografía tomada por el autor de la tesis.

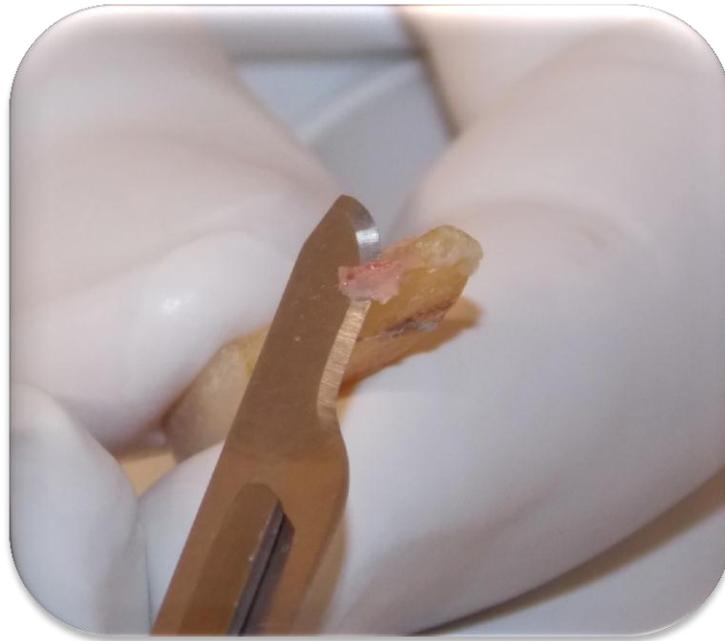


Figura 9. Remoción de restos de tejido. Imagen tomada por el autor de la tesis.

Las raíces a utilizar (50) durante el estudio será en piezas unirradiculares mandibulares y raíces mesiales de molares maxilares y mandibulares.

Criterios de inclusión y exclusión:

- Órganos dentarios de recién extracción.
- Raíces con una curvatura no mayor a 35°
- Órganos dentarios que no hayan recibido un tratamiento de conductos con anterioridad.
- Órganos dentarios con formación radicular completa.

Decoronación y estandarización de la longitud radicular.

Se decoronaran las piezas que se incluyan en el estudio estandarizando la longitud radicular a 15 mm.



Figura 10. Estandarización de la longitud radicular. Imagen tomada por el autor de la tesis.

- La decoronación radicular se llevará a cabo con pieza de baja velocidad, disco de carburo e irrigación con agua durante el corte.



Figura 11. Decoronación de los órganos dentarios. Imagen tomada por el autor de la tesis.

Se revisará la permeabilidad del conducto radicular utilizando una lima de diámetro 10 a longitud total y se van a ampliar los conductos a un diámetro 20 a longitud de trabajo (14.5mm) para su posterior esterilización (Fig. 8).



Figura 12. Permeabilización de los conductos.

Imagen tomada por el autor de la tesis

Esterilización de los conductos radiculares incluidos en el estudio (Fig. 13).



Figura 13. Autoclave para la esterilización de las muestras a incluir en el estudio.

Tomada de <http://wisevigor.en.made-in-china.com/product/eoRQNPLGgIkh/China-En-13060-Class-B-Vacuum-Table-Top-Dental-Autoclave-Sterilizer-STE-18L-Z-.html>

Cada conducto radicular se va a introducir dentro de un esterclave con 5 mm de caldo de enriquecimiento (Miuller Hinton) y se van a llevar las muestras al autoclave a 121 ° C por 15 min a 1 lb de presión.

Contenedores esterclave, para el almacenamiento y cultivo de la cepa dentro de las muestras (fig. 14).



Fig. 14 Tomada de <http://www.promosadental.com/esterilizadores.html>

Obtención y cultivo de la cepa de *E. faecalis* para posteriormente inocularla dentro de las muestras.

- Se obtiene la cepa viable congelada de *E. faecalis*.

Cultivo de la cepa en un medio de agar sangre (Fig. 15).

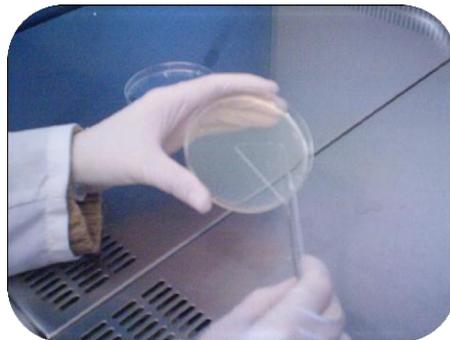


Figura 15. Siembra de la cepa.

Tomada de <http://www.ugr.es/~mgarrido/Protocolos.html>

Incubación de la cepa durante 24 hrs en un medio aerobio a 37°C para la posterior obtención de las colonias (Fig. 16 y 17).



Figura 16. Cultivo de *E. Faecalis*

Tomada de <http://superdinosaurioazul.blogspot.mx/2011/11/especies-patogenas.html>

En 5 ml de un caldo de enriquecimiento (Muller-Hinton) se inocularan colonias bacterianas (procedimiento a realizar para cada una de las muestras).



Fig. 17 Recolección de las cepas bacterianas.

Tomada de

<http://dentizta.ccadet.unam.mx/Instrumenta/contenido/practicass/bacteriologia/solidos.htm>

La valoración de la carga bacteriana de cada uno de los caldos de enriquecimiento se llevara a cabo mediante la nefelometría de Mc Farland.

- La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana (Fig. 18).

Consta de 10 estándares y mediante espectrofotometría se determina la concentración bacteriana en las disoluciones (Tabla 2).

Se utilizará el tubo No. 5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^9$ ufc/ml) para comparación al momento pico de reproducción bacteriana.

ESCALA DE Mc FARLAND

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Tabla 2. Escala de Mc Farland

Tomada de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>

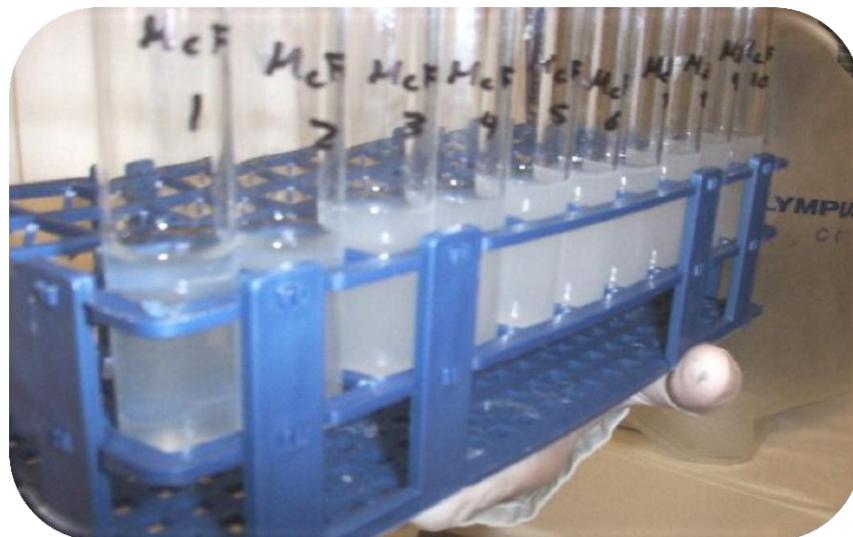


Figura 18. Escala de Mc Farland en tubos de ensaye para comparar el momento pico de la reproducción bacteriana a través de la turbidez del tubo No. 5 en la escala Vs el caldo de enriquecimiento previamente contaminado.

Tomada de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>

Con una micropipeta se inocula en el conducto radicular con 2 microlitros de la suplección bacteriana y el resto de está (cbp 5ml) se coloca en el interior del esterclave para posteriormente sumergir la muestra ya contaminada y llevar las muestras a incubarlas a 37 °C durante 24 hrs permitiendo el desarrollo aun mayor de la cepa y la contaminación de los conductos radiculares a utilizar.

El total de las muestras se dividirá en tres grupos dejando 23 muestras para el grupo A (con terminación apical a un diámetro 35), 23 muestras para el grupo B (con terminación apical a un diámetro 45) y 4 muestras para un grupo control.

GRUPO A:

Este grupo será preparado con fresas gates glidden 3 y 2 llevándolas 5 y 10 mm al interior del conducto respectivamente, en un siguiente paso utilizaremos un contrangulo de acción recíprocante para ampliar el conducto a un diámetro 30 hasta la longitud de trabajo (14.5mm) y finalmente un instrumento rotatorio K3 de diámetro 35 y con conicidad 04 terminar la preparación radicular llevando ésta a longitud de trabajo.

GRUPO B:

Este grupo será preparado con fresas gates glidden 3 y 2 llevándolas 5 y 10 mm al interior del conducto respectivamente, en un siguiente paso utilizaremos un contrangulo de acción recíprocante para ampliar el conducto a un diámetro 30 hasta la longitud de trabajo (14.5mm) y finalmente un instrumento rotatorio K3 de diámetro 45 y con conicidad 04 terminar la preparación radicular llevando ésta a longitud de trabajo.

Durante la preparación del canal radicular en cada una de las muestras, entre el uso de un instrumento y otro se irrigará con 2 ml de Hipoclorito de Sodio al 5.25% activándolo de manera indirecta con el ultrasonido.

En la irrigación posterior al uso del último instrumento a trabajar dentro del conducto se irrigará con Hipoclorito de Sodio al 5.25% activándolo de manera indirecta con el ultrasonido durante 1 min.

Una vez realizada la preparación y conformación de los conductos radiculares en las muestras de acuerdo a las características necesarias para cada uno de los grupos se coloca un apósito de Oxido de Zn con Eugenol en la entrada del conducto en cada muestra con el propósito de sellarla.

Realizado el paso anterior, cada una de las muestras se introducirá nuevamente en 5 ml de un nuevo caldo de enriquecimiento (Miuller Hinton) y se llevan a una incubadora en condiciones aerobias a 37°C durante 24 hrs permitiendo a las bacterias remanentes dentro del conducto vuelvan a recolonizarlo.

Posterior a la incubación de las muestras, éstas se analizarán mediante biología molecular para determinar si hay presencia de la cepa bacteriana o no existe y en qué cantidad, en cada uno de los grupos.

Lo anterior nos ayuda a determinar si influye el diámetro de terminación apical para una mayor o menor recolonización bacteriana.

Para el proceso de extracción como se cita a continuación es conveniente decir que, para tal se utilizó un equipo de nueva generación (ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep) (Fig. 15).

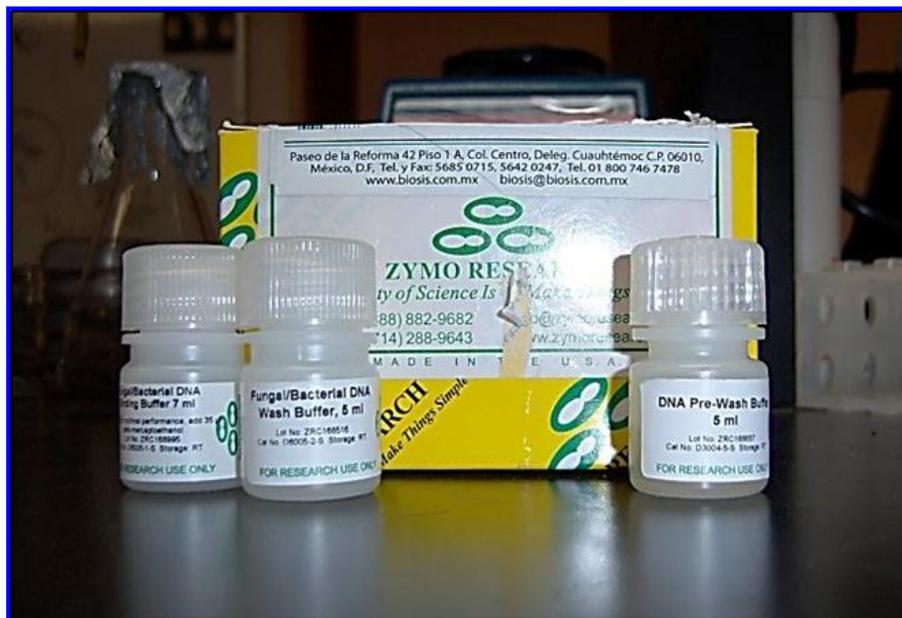


Figura 19. Kit utilizado para extracción de ácidos nucleicos de nueva generación ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep.

Tomada de <http://www.alkaliscientific.com/en/221-total-rna-purification-kits>

9.4.1.2 Proceso de extracción de ácidos nucleicos.

1. Colocar en un tubo eppendorf 200 µl de solución de PBS y agregar de 50 a 100 mg de micelio para suspensión de la muestra.

NOTA: de ser necesario utilizar vortex por un lapso de 2 minutos para la resuspensión.

2. Una vez resuspendido el micelio transferirlo a un primer tubo, el cual contiene pequeñas perlas de porcelana las cuales ayudarán a la lisis para extracción de nuestro ácidos nucleicos (Bashing Bead Lysis tube), agregar 750 µl de sol. Para lisis (Lysis Solution), llevar a vortex (vel. Máxima lapsos de 1min a 40seg hasta sumatoria de 5 min).
3. Llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.
4. Colocar en un tubo de tapa naranja (Zymo - Spin IV Spin Filter) 400 µl del sobrenadante obtenido de nuestro anterior tubo, llevar a microcentrífuga a 7,000 rpm por un lapso de 1min.

NOTA: recordar quebrar la punta de la parte del filtro antes de realizar el proceso de transferencia.

5. Una vez terminado en tiempo de centrifugado retirar la parte superior de tubo (tapa naranja solo el filtro) y a la parte inferior donde tenemos el fluido agregamos 1,200 µl de buffer para precipitación (Basal Fungal/Bacterial Binding Buffer) y mezclamos cuidadosamente.

- A. En un tubo nuevo con filtro (Zimo - Spin IIC colum) procedemos a transferir 800 μ l de nuestra mezcla previa, llevar a microcentrífuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min., procedemos a desechar el liquido de la parte inferior.
- B. Repetir el paso A.
6. En un nuevo tubo colector procedemos a colocar solo la parte superior (columna) de nuestro tubo utilizado en el apartado A del paso 5, procedemos a agregar 200 μ l buffer de pre lavado (DNA Pre - Wash Buffer), llevar a microcentrífuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.
7. Agregar 500 μ l buffer de lavado (Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer), llevar a microcentrífuga a 10,000 rpm por lapso de 1 min.
8. Transferir sólo la columna de paso 7 a un tubo eppendorf y agregar 63 μ l el buffer de elución el cual nos servirá para recuperar nuestros ácidos nucleicos (DNA Elution Buffer).

9.4.2 Reactivos utilizados.

Buffer TAE 50X (para 500mL)

Formulación:

Trizma – Base (Sigma- Aldrich).	121g
Acido acético (J.T. Baker).	28.6 mL
EDTA Concentración 0.5M/pH 8.0.	50 mL
Agua bidestilada cbp.	500 mL

Preparación:

Colocar en matraz aforado de 500 mL 121g de Trizma – Base (Sigma- Aldrich) en 250mL de agua bidestilada y agitar hasta disolución completa.

Proceder a agregar 28.6 mL de ácido acético (J.T. Baker) y agitar, adicionar 50 mL de EDTA (Ac. Etilendiaminotetraacético) Concentración 0.5M/pH 8.0 y agitar cuidadosamente, completar aforo a 500 mL con agua bidestilada y envasar.

Gel de agarosa (1.5 %).

Formulación:

Agarosa para electroforesis (Sigma - Aldrich) 0.75 g

Buffer TAE 1x 50 mL

Bromuro de etidio (Sigma - Aldrich) 10 mg/mL

Preparación:

Pesar en balanza analítica 0.75g de agarosa para electroforesis (sigma – Aldrich) colocar el vaso de precipitado.

Con ayuda de probeta graduada medir un vol. de 50 mL de buffer TAE 1x y verter en el vaso de precipitado, disolver mediante calor utilizando parrilla eléctrica u horno de microondas.

Verter al molde para electroforesis y dejar enfriar un poco, agregar el bromuro de etidio con mucha precaución antes de la solidificación de nuestro gel proceder a agitar y dejar solidificar \pm 25min.

9.4.3 Método de electroforesis.

1. Elaboración de gel de agarosa, una vez hecho este paso procedemos a agregar buffer TAE 1x hasta que cubra por completo nuestro gel.

Colocamos en los canales correspondientes las muestras de nuestros microorganismos previamente preparadas (aprox. 2 μ l de buffer de carga + 8 μ l de muestra de ADN) así como un marcador de peso molecular para la identificación de bases.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

En base a los artículos citados, observamos que una de las bacterias más frecuentemente aisladas en afecciones pulpares y perirradiculares es el *E. Faecalis* y estos hallazgos se pueden explicar gracias a sus características en cuanto a su virulencia y capacidad de supervivencia ante medios adversos, incluyendo la habilidad para competir con otros microorganismos, invadir los tubulillos dentinarios y su resistencia a una privación nutricional como lo describen en su estudio Portenier I, *et. al.*, 2003 y Facklam R, *et. al.*, 1999. Se ha encontrado que con una adecuada técnica aséptica, el incremento en el diámetro de preparación apical, además, del uso de hipoclorito de sodio como agente irrigante, son los métodos más efectivos para la eliminación del *E. Faecalis*. Debido a las características de esta cepa, se decidió anexarla a la metodología del estudio como microorganismo idóneo para la contaminación de las muestras, y al hipoclorito de sodio como agente irrigante ya que es uno de los más utilizados y que ha arrojado mejores resultados durante la limpieza quimicomecánica en la preparación de los conductos. Otro dato de interés dentro de esta metodología, es aquel, donde se menciona que un incremento en nuestros diámetros de preparación apical nos ayuda a obtener una mejor limpieza y eliminación de las cepas bacterianas que se alojan dentro del sistema de conductos radiculares, esto ha generado gran controversia dentro de los distintos autores de artículos, ya que mencionan que la conservación de la anatomía del conducto radicular original, es importante por lo que debemos eliminar la cantidad dentina necesaria para asegurar la limpieza, pero, conservando el máximo posible de dentina residual y así, mantener la porción del foramen apical realizando un ensanchamiento cuidadoso y mínimo del agujero apical sin perder o modificar su posición. Cohen el 2002 señala que los conductos ensanchados aceptan un mayor volumen de solución irrigadora potencializando la limpieza, favoreciendo la eliminación del barrillo dentinario, eliminación de una mayor parte de tejido pulpar, bacterias y endotoxinas; en la metodología realizada se compararán dos diámetros de preparación apical distintos para finalmente evaluar el grado de recolonización

bacteriana en cada uno de ellos para, en cierta forma, determinar qué tan importante es el ampliar los diámetros al momento de la conformación de los conductos. La metodología utiliza la PCR para llevar a cabo el análisis de los distintos grupos y las muestras que se incluyen en cada uno de ellos, la PCR es elegida sobre la microbiología ya que por medios microbiológicos convencionales hay muchas razones que provocan que sean incultivables algunos tipos de microorganismos, tales como:

1. Falta de nutrientes esenciales o factores de crecimiento en el medio de cultivo artificial.
2. Condiciones de sobrealimentación.
3. La toxicidad del medio de cultivo en sí, que puede inhibir el crecimiento bacteriano.
4. La producción de sustancias inhibitoras del microorganismo ocasionado por otras especies presentes en un consorcio mixto.
5. La dependencia metabólica de otros microorganismos.
6. La interrupción de algunos sistemas de comunicación entre algunas bacterias al separar o aislar la bacteria para su cultivación.
7. Condiciones para su conservación.

Dentro de la PCR se utiliza la biología molecular, empleando el ADN y RNA bacteriano lo que le confiere a esta técnica bastante exactitud y selectividad a la hora de realizar el análisis, evitando posibles sesgos en los resultados, como lo describen (Wade, 2002; Siqueira *et. al.*, 2008).

CONCLUSIÓN

- Observar en cuál de los dos diámetros de terminación apical 35 o 45 existió una mayor reducción en la población de colonias bacterianas en base a la metodología propuesta, orientándonos sobre la relevancia que tiene una mayor o menor eliminación de tejido dentinario al momento de realizar la instrumentación y conformación del sistema de conductos radiculares y que tan conveniente es respetar en lo posible la anatomía original de los mismos.
- Para observar en cuál de los dos diámetros de preparación apical existe una mayor recolonización bacteriana, se determinará la metodología más adecuada para analizar cada uno por separado y comparar los resultados y poder determinar si realmente existe diferencia en cuanto a la recolonización bacteriana que se presenta entre los distintos diámetros de terminación apical al momento de finalizar la conformación de los canales radiculares

RECOMENDACIONES

Este estudio nos puede apoyar u orientar, para poder guiarnos al momento de realizar la preparación de los conductos radiculares y así poder determinar en base a los resultados que arroje, qué diámetros nos resultan más convenientes para tener mayor probabilidad de éxito, evitando una posible reinfección bacteriana. Sería importante en un estudio posterior anexar a la metodología propuesta en este trabajo, la medicación intraconducto, para examinar qué tan importante es el utilizar ésta entre cita y cita, y tratar de realizarlo *in vivo* examinando las muestras, al igual que en nuestra metodología, por medio de la PCR, ya que nos arrojará una información más certera y aunque algunas de las bacterias remanentes dentro de los conductos no se puedan cultivar por medios microbiológicos convencionales, la biología molecular nos va a ayudar a determinar si hay algunos remanentes bacterianos y tratar de reconocer los que se hayan detectado.

ANEXOS.

Grupo	Especie
<p>Grupo I</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. ayium.</i> <i>E. gilvus.</i> <i>E. malodoratos.</i> <i>E. pallens.</i> <i>E. pseudoavium.</i> <i>E. raffinosus.</i> <i>E. saccharolyticus.</i></p>
<p>Grupo II</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. faecalis.</i> <i>E. faecium.</i> <i>E. casseliflavus.</i> <i>E. gallinarum.</i> <i>E. mundt.</i> <i>Lactococcus.</i></p>
<p>Grupo III</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(+) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. dispar.</i> <i>E. durans.</i> <i>E. hare.</i> <i>E. porcinus (E. villorum).</i> <i>E. ratti.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. asini.</i> <i>E. coecorum.</i> <i>E. sulfureus.</i></p>
<p>Grupo IV</p> <p>(+) Formación de ácido en caldo de manitol.</p> <p>(-) Formación de ácido en caldo de sorbosa.</p> <p>(-) Hidrolisis de arginina.</p>	<p><i>E. columbae.</i> <i>Vagococcus sp.</i></p>

Categorización de las especies de Enterococcus.

Tabla 1

Tomada de Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Escala de Mc Farland

Tabla 2

Tomada de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>

Bibliografía.

1. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*1995; 59(1):143-69.
2. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*1991; 29(12):2838-42.
3. Baca García P, Baca García A, Maestre Vera JR. Microbiología de la caries. En: Liébana Ureña. *Microbiología Oral*. Madrid. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.,2002; 561-570
4. Beerens H, Gérard A, Guillaume J: Etude de 30 souches de *Bifidobacterium bifidum* (*Lactobacillus bifidus*). Caractérisation d'une variété buccale. Comparaison avec les souches d'origine fécale. *Ann Inst Pasteur Lille* 1957; 9:77-85.
5. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005, 33: 248-255.
6. Bernimoulin JP. Conceptos recientes sobre formación de placa. *J Clin Periodontol* 2003; 30:7-9.
7. Berutti e, Marini r. A scanning electron microscopic evaluation of the debridement capability of sodium hypochlorite at different temperatures. *J Endod* 1996: 22(9):467-70.
8. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adams SE, Allison C, Beighton D. The Predominant Aciduric Microflora of Root-caries Lesions. *J Dent Res* 2001, 80(9): 1828-1833.
9. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol* 2004, Vol.42, 7: 3128-3136.

10. Chhour K-L, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular Analysis of Microbial Diversity in Advanced Caries. *J Clin Microbiol* 2005, 43(2): 843-849.
11. Cisar JO, Sandberg AL, Clark WB. Molecular aspects of adherence of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* to oral surfaces. *J Dent Res* 1989, 68(Spec Iss): 1558-1559.
12. COHEN, B. Vías de la pulpa. 1999. Ed. Harcourt. Madrid, España. Págs: 206,207.
13. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. Microbial Risk Indicators of Early Childhood Caries. *J Clin Microbiol* 2005, 43(11): 5753-5759.
14. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:435-64.
15. Costerton JW. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriology* 1994; 176:2137-42.
16. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995, 15: 137-140
17. Delwiche EA, Pestka JJ, Tortorello ML. The veillonellae: gram-negative cocci with a unique physiology. *Annu Rev Microbiol* 1985, 39: 175-193.
18. Donlan, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 167-93.
19. DRAKE, DR., WIEMANN, AH. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J of Endod.* 1994. 20(2): 78-82. En: GARCÍA, G., OLIVO, RA., OCHOA, CA. Complicaciones con el hipoclorito de sodio (NaOCL) al entrar en contacto con los tejidos periradiculares. *Univers Odont.* 2001. 21(45):26-29.
20. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spano JCE, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13(2):113-7.

21. Fine DH. Mouthrinses adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 1988; 1:259-63.
22. Gilmore MS. The *Enterococci*: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: ASM Press, 2002.
23. Grossman LI. Endodontic practice, 1970.
24. Gutierrez de Ferro MI, Ruiz de Valladares RE, Benito de Cardenas IL. Recuperación de veillonellas a partir de saliva. *Rev Argent Microbiol* 2005, 37(1):22-25.
25. HAUMAN C, LOVE R. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *INT endod J.* 2003; 36:75-85.
26. Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent* 1985, 64: 1195-1198
27. Hughes CV, Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH Coaggregation properties of human oral Veillonella spp.: relationship to colonization site and oral ecology. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54: 1957-1963.
28. Johnson, B., Remeikis, N. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. 1993. *J of Endod.* 19(1):40-43.
29. Kakehashi *et al*, 1965; Sundqvist 1976, Moller *et al*, 1981, (adicionar citas más recientes).
30. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 22:822–30.
31. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56: 3890-3894.
32. Könönen E, Kanervo A, Takala A, Asikainen S, Jousimies-Somer H. Establishment of oral anaerobic microflora during the first year of life. *J Dent Res* 1999, 78: 1634-1639.

33. Liebana Ureña 1995 Interamericana, McGraw-Hill
34. Liljemark WF, Gibbons RJ. Ability of Veillonella and Neisseria species to attach to oral surfaces and their proportions present indigenously. Infect Immun 1971, 4:264-268.
35. Lingstrom P, van Ruyven FO, van Houte J, Kent R. The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. J Dent Res 2000, 79: 770-777.
36. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986, 50: 353-380.
37. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. Caries Res 2001, 35:397-406.
38. Marsh PD. Dental plaque as biofilm. J Industrial Microbiology 1995; 15:169-75.
39. McBride BC, van der Hoeven JS. Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens*. Infect Immun 1981, 33:467-472.
40. Mchugh C, Zhang P, Michalek S, Eleazer p. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004; 30: 218-9.
41. Milnes AR, Bowden GH. The microflora associated with developing lesions of nursing caries. Caries Res 1985, 19:289-297.
42. Min M, Brown C, Legan J, Kafrawy A. In Vitro evaluation of effects of ultrasonic root end preparation on resected root surface. J Endod. 1997 Oct; 23(10): 624-28.
43. Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. Occurrence of the Family Bifidobacteriaceae in Human Dental Caries and Plaque. Caries Res 2006, 40:271-276.
44. Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect Immun 1985, 48:507-519.

45. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. *J Clin Microbiol* 2004, 42(7): 3023-3029.
46. Nagaoka S, Liu H-J, Minemoto K, Kawagoe M. Microbial induction of dentinal caries in human teeth in vitro. *J Endodont* 1995, 21:546-551.
47. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21: 283-8.
48. Paranjpe A, de Gregorio C, Gonzalez AM, Gomez A, Silva Herzog D, Piña AA, Cohenca N. Efficacy of the self-adjusting file system on cleaning and shaping oval canals: a microbiological and microscopic evaluation. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):226-31. Epub 2011 Dec 5.
49. Piskin, B., Türkün, M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J of Endod*. 1995. 21(5):253-255.
50. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* & endash : the root canal survivor and star in posttreatment disease. *Endod Topics* 2003; 6: 135-159.
51. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995; 22:1-14.
52. Reig R, Laiolo J, Navia A, Reboredo E, Romelli 1952.
53. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 1992; 327(5):293-301.
54. Relman DA. Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(3):382-9.
55. Relman DA. The 'emergence' of *Bartonella* and the development of molecular discovery methods for microbial pathogens. *Neth J Med* 1998; 52(6):249-55.

56. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 1993; 168(1):1-8.
57. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30:315–20.
58. Rudolf Beer, Michael A. Baumann. Atlas de endodoncia 1998 Elsevier España. Pags. 1-15.
59. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003; 7:181-8.
60. Scardovi V. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen; in Sneath PHA: Mair NS; Sharpe ME, Holt JG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986, vol 2, pp 1418-1434.
61. Schûpbach P, Osterwalder V, Guggenheim B. Human Root Caries: Microbiota of a Limited Number of Root Caries Lesions. *Caries Res* 1996, 30:52-64.
62. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008; 34:1291–301. e3.
63. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005; 31(6):411-23.
64. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2, 5% and 5, 25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 26(6):331-4.
65. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30:297–306.
66. Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol* 2000 2003; 3:12-55.

67. Stephen Cohen, 2002. Translation of Cohen: Pathways of the Pulp, 8e
68. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:86–93.
69. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001, 65: 1028-1037.
70. Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington: ASM Press, 2003:422–33.
71. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2622–36.
72. Tong H, Gao X, Dong X. *Streptococcus oligofermentans* sp.nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, 53: 1101-1104
73. Van Houte J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. *J Dent Res* 1994,73(3):672-681.
74. Becker MR, Paster BJ, Leys EL, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol* 2002,40(3): 1001-1009
75. Wade W. Unculturable bacteria-the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med* 2002; 95(2):81-3.
76. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 1990; 345(6270):63-5.
77. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32(5):389-98.