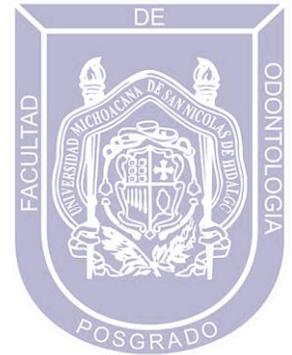




**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA

TESIS

**“COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE UN
HIDROGEL DE ÓXIDO DIALIL DISULFURO MODIFICADO EN RELACIÓN AL
HIDRÓXIDO DE CALCIO”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

PRESENTA:

C.D. MAYRA LIZETH MEJÍA BARRIGA

ASESORA DE TESIS: M. C. O. LAYSA YANINA GARCÍA CHÁVEZ

MORELIA, MICHOACÁN

MÉXICO FEBRERO DE 2019

DEDICATORIA

A mis padres ya que sin ellos y sin su apoyo incondicional no habría podido realizar esta parte fundamental de mi formación académica, por enseñarme a esforzarme para alcanzar mis metas, que todo se consigue a base de trabajo y sacrificios, por creer en mí siempre, por su amor y por haber hecho de mí la persona que soy hoy.

A mis hermanos, que sin ellos nada sería igual, a pesar de encontrarnos en caminos diferentes siempre están cuando los necesito.

A mi novio por estar en los buenos y malos momentos y darme ánimos cuando ya no podía más, por creer en mí, y ayudarme a crecer como persona, por ser mi mejor amigo.

A mis compañeros de clase, por haber compartido experiencias, risas, lágrimas conmigo y hacer que esta etapa fuera más corta y divertida.

A todos muchísimas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A las personas que hicieron posible este trabajo:

Principalmente al M.C. Héctor Ruiz Reyes, quien fue mi guía en este proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo, además del tiempo que invirtió y la paciencia que tuvo. También por motivarme a aprender más cada día y abrirme las puertas en el área de la investigación, por brindarme la confianza y su amistad durante este tiempo. Hacen falta más profesores como usted.

Al equipo que labora en Laboratorio DIPROMI por brindarme su apoyo y colaboración, en especial al Q.F.B. Juan Manuel Barajas Magallón y a la Q.F.B. Sandra Suárez Moreno, por ser partícipes de este trabajo de investigación, por guiarme en el ámbito microbiológico y brindarme todas las facilidades y la confianza para poder llevar a cabo la fase experimental de este proyecto.

A la M. C. O. Laysa Yanina García Chávez, por aceptar la invitación para ser mi asesora principal de tesis, además de brindarme su amistad durante varios años ya, por su tiempo y dedicación para concluir este trabajo.

Al C. D. E. E. Benigno Miguel Calderón Rojas, por tomarse el tiempo para ayudarme a terminar este trabajo, por las recomendaciones para mejorarlo, por mantenerse siempre positivo ante las adversidades que se presentaron y por ser uno de los pocos profesores que se comprometen y marcan la diferencia con sus alumnos.

Al C. D. E. E. Martín Alberto Loeza Martínez, por formar parte del equipo de revisores y sinodales, es una de las personas que más admiro en el ámbito profesional y de quien he aprendido mucho.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES GENERALES	14
2.1. Invasión bacteriana de la pulpa	14
2.2. Biofilm	14
2.2.1. Formación de Biofilm	14
2.2.2. Quórum Sensing	15
2.2.3. Biofilm extrarradicular	16
2.2.4. Biofilm periapical	17
2.3. Periodontitis Apical	17
2.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.5. Medicación intraconducto	21
2.5.1. Tipos de medicación intraconducto	22
2.5.1.1. Hidróxido de Calcio	23
2.5.1.2. Clorhexidina	25
2.5.1.3. Pasta Triantibiótica	28
2.5.1.4. Clindamicina	30
2.6. Soluciones de Superoxidación (SSO)	32
2.7. Hidrogeles	35
2.8. Óxido Dialil Disulfuro Modificado (ODD-M)	36
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	40
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
4.1. Pregunta de Investigación	48
5. JUSTIFICACIÓN	49
6. HIPÓTESIS	51
6.1. Hipótesis de trabajo	51
6.2. Hipótesis nula	51

7. OBJETIVOS	51
7.1. Objetivo general	51
7.2. Objetivos específicos	51
8. MATERIAL Y METÓDOS	52
8.1. Tipo de estudio	52
8.2. Variables	52
8.3. Reactivos	52
8.4. Estandarización del depósito de hidrogeles	53
8.4.1. Colocación de reactivos en dispositivos dispensadores	53
8.5. Preparación de las pastas	53
8.5.1. Preparación de la medicación convencional de Ca(OH) ₂	54
8.6. Clasificación de los grupos de estudio	54
8.7. Preparación del medio de cultivo	55
8.8. Cepas	55
8.9. Preparación del inóculo bacteriano	55
8.10. Inoculación de las Placas	56
8.11. Acondicionamiento de cavidades en medios de cultivo	57
8.12. Colocación de hidrogeles y pastas en cavidades	58
8.13. Incubación de medios de cultivo	58
8.14. Medición de halos de inhibición	59
9. RESULTADOS	60
9.1. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	60
9.1.1. Halos de inhibición formados en la cepa de <i>S. aureus</i>	60
9.1.2. Halos de inhibición formados en la cepa de <i>E. faecalis</i>	61
9.1.3. Halos de inhibición formados en la cepa de <i>C. albicans</i>	62
9.1.4. Halos de inhibición formados en la cepa de <i>S. mitis</i>	63
9.2. Análisis Bioestadístico	65
9.2.1. Estadística Descriptiva	65
9.2.2. Estadística Inferencial	67
9.2.3. Tablas de Confrontaciones	67

10. DISCUSIÓN	70
11. CONCLUSIÓN	74
12. REFERENCIAS	75
13. ANEXOS	86

INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1: Principales especies bacterianas encontradas en infecciones endodónticas.	18
Tabla 2: Tipos de vehículos utilizados en la elaboración de la pasta de Ca(OH) ₂ .	25
Tabla 3: Clasificación y preparación de los inóculos bacterianos.	55
Tabla 4: Relación del medio de cultivo con la suspensión bacteriana.	56
Tabla 5: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por la pasta de Ca(OH) ₂ ULTRACAL™ XS™ en las cepas bacterianas.	65
Tabla 6: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de SSO en las cepas bacterianas.	65
Tabla 7: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de Clindamicina en las cepas bacterianas.	65
Tabla 8: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de ODD-M en las cepas bacterianas.	66
Tabla 9: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de Clorhexidina en las cepas bacterianas.	66
Tabla 10: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por la pasta de Ca(OH) ₂ VIARDEN en las cepas bacterianas.	66
Tabla 11: Confrontaciones <i>S. aureus</i> .	67
Tabla 12: Confrontaciones <i>E. faecalis</i> .	68
Tabla 13: Confrontaciones <i>C. albicans</i> .	68
Tabla 14: Confrontaciones <i>S. mitis</i> .	69
Tabla 15: Concentraciones de Alicina utilizadas en estudios <i>in vitro</i> previos.	86

INDICE DE FIGURAS

	CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1.	Biofilm dentro del conducto radicular (Haapasalo y cols. 2007).	15
Figura 2.	Crecimiento bacteriano de <i>E. faecalis</i> en medio de cultivo.	19
Figura 3.	Estructura química de Ca(OH) ₂ .	23
Figura 4.	Estructura química Clorhexidina.	26
Figura 5.	Obtención de la molécula Alicina en los dientes de ajo.	37
Figura 6.	Remoción de hidrogel de superoxidación en comparación con el Ca(OH) ₂ .	50
Figura 7.	Reactivos en presentación comercial.	52
Figura 8.	Colocación de reactivos en dispositivos dispensadores.	53
Figura 9.	ULTRACAL™ XS™.	53
Figura 10.	Ca(OH) ₂ VIARDEN.	53
Figura 11.	Preparación de la pasta de Ca(OH) ₂ .	54
Figura 12.	Jeringas con los reactivos.	54
Figura 13.	Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.	55
Figura 14.	Preparación del inóculo bacteriano.	56
Figura 15.	Medios de cultivo.	56
Figura 16.	Inoculación de las placas.	57
Figura 17.	Acondicionamiento de cavidades en medios de cultivo.	57
Figura 18.	Distribución de hidrogeles y pastas en medios de cultivo.	58
Figura 19.	Colocación de hidrogeles y pasta de Ca(OH) ₂ .	58
Figura 20.	Incubación de medios de cultivo.	59
Figura 21.	A. Vernier. B. Medición de los halos de inhibición.	59

Figura 22. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>S. aureus</i> vistos sobre un negatoscopio.	60
Figura 23. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>S. aureus</i> vistos a contraluz.	60
Figura 24. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>E. faecalis</i> vistos sobre un negatoscopio.	61
Figura 25. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>E. faecalis</i> vistos a contraluz.	61
Figura 26. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>C. albicans</i> vistos sobre un negatoscopio.	62
Figura 27. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>C. albicans</i> vistos a contraluz.	62
Figura 28. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>S. mitis</i> vistos sobre un negatoscopio.	63
Figura 29. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en <i>S. mitis</i> vistos a contraluz.	63
Figura 30. Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.	64
Figura 31. A. Fisión binaria de <i>S. aureus</i> , la cual se observó a través del microscopio después de la incubación, con la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. B. Microscopio	64

RESUMEN

Introducción: La pasta de hidróxido de calcio es el compuesto que se utiliza como estándar de oro en la medicación intraconducto a nivel mundial. Sin embargo, existe controversia en relación a su efecto antimicrobiano en distintas especies bacterianas que colonizan el sistema de conductos^{36,85,86,93,98}. Por tal motivo, es importante investigar nuevos principios activos que tengan un efecto antimicrobiano de amplio espectro contra estas bacterias. En la actualidad existe en el mercado un producto en forma de hidrogel con un principio activo derivado del ajo denominado Óxido Dialil Disulfuro Modificado.

Objetivo: Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* de 2 pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en relación a un hidrogel a base de Óxido Dialil Disulfuro Modificado (ODD-M).

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio experimental *in vitro*, comparativo en el cual se realizaron ensayos de sensibilidad antimicrobiana en cepas ATCC de *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* y *S. mitis*, que fueron sembradas en medios de cultivo de agar sangre y Mueller-Hinton, a los cuales se les realizaron perforaciones con una micropipeta Pasteur, donde se colocaron las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y los hidrogeles a base de ODD-M, CHX, Superoxidación y Clindamicina, se incubaron las muestras durante 24h a 37°C, posteriormente se midieron los diámetros de los halos de inhibición formados por cada medicamento. Para el análisis bioestadístico se utilizó la prueba de t student a IC 95%.

Resultados: Los resultados mostraron que hidrogel de ODD-M fue altamente efectivo en inhibir el crecimiento bacteriano. Presentando halos de inhibición en *S. aureus* de 19.91 ± 0.66 mm, *E. faecalis* de 10.98 ± 0.63 mm, *C. albicans* de 20.08 ± 0.8 mm y *S. mitis* de 11.58 ± 49 mm. El hidrogel a base de CHX presento halos inhibitorios en *S. aureus* de 19.33 ± 0.6 mm, *E. faecalis* de 11.75 ± 0.41 mm, *C. albicans* de 19 ± 1.54 mm y *S. mitis* 11.75 ± 0.88 mm. El hidrogel a base de Clindamicina únicamente inhibió *S. aureus* (28.91 ± 1.28 mm) y *S. mitis* (39.08 ± 1.02 mm). El hidrogel de superoxidación no presentó inhibición bacteriana en

ninguna de las cepas evaluadas en el estudio. Las pastas de Ca(OH)_2 , no formaron halos de inhibición bien definidos en ninguna de las cepas evaluadas.

Conclusión: En relación a los resultados reportados en el presente estudio se concluye que el hidrogel a base de ODD-M presentó el mismo efecto antimicrobiano que el hidrogel de CHX en las cepas evaluadas de *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mitis* y *C. albicans*. Es importante señalar que en comparación con el Ca(OH)_2 , su eficacia antimicrobiana fue superior. El hidrogel a base de ODD-M podría ser un buen candidato para ser empleado como medicación intraconducto debido a que presentó un buen efecto antimicrobiano en las cepas que fueron evaluadas en este estudio, sin embargo, se deben realizar estudios complementarios previos a su uso *in vivo*.

Palabras clave: Endodoncia, *Enterococcus faecalis*, medicación intraconducto, acción antibacterial, hidrogel.

ABSTRACT

Introduction: Calcium hydroxide paste is the compound used as a worldwide standard intracanal medication. However, there is controversy regarding its antimicrobial effect in different bacterial species that colonize the root canal system^{36,85,86,93,98}. For this reason, it is important to investigate new active principles that have a broad spectrum antimicrobial effect against these bacteria. Currently, there is a product in the form of a hydrogel with an active ingredient derived from garlic called Modified Diallyl Disulfide Oxide.

Aim: To compare the antimicrobial effect in vitro of two Ca(OH)₂ pastes and an hydrogel based of Modified Diallyl Disulfide Oxide (ODD-M).

Methodology: An *in vitro* experimental comparative study was carried out in which antimicrobial sensitivity assays were performed on ATCC strains of *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* and *S. mitis*, which were seeded on blood agar culture media and Mueller-Hinton, which were drilled with a Pasteur micropipette, where the Ca(OH)₂ pastes and hydrogels based on ODD-M, CHX, superoxidation and Clindamycin were placed, the samples were incubated for 24 hours at 37°C. The diameters of the inhibition zones formed by each drug were subsequently measured. For the biostatistical analysis, the student t-test at 95% CI was used.

Results: The results showed that ODD-M hydrogel was highly effective in inhibiting bacterial growth, showing zones of inhibition in *S. aureus* of 19.91 ± 0.66 mm, *E. faecalis* of 10.98 ± 0.63 mm, *C. albicans* of 20.08 ± 0.8 mm and *S. mitis* of 11.58 ± 49 mm. The CHX-based hydrogel showed inhibition zones in *S. aureus* of 19.33 ± 0.6 mm, *E. faecalis* of 11.75 ± 0.41 mm, *C. albicans* of 19 ± 1.54 mm and *S. mitis* 11.75 ± 0.88 mm. The Clindamycin-based hydrogel only inhibited *S. aureus* (28.91 ± 1.28 mm) and *S. mitis* (39.08 ± 1.02 mm). The superoxidation hydrogel showed no bacterial inhibition in any of the strains evaluated in the study. The Ca(OH)₂ pastes did not form well-defined inhibition zones in any of the evaluated strains.

Conclusion: In relation to the results reported in the present study, it is concluded that the ODD-M hydrogel presented the same antimicrobial effect as the CHX hydrogel in the evaluated strains of *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mitis* and *C. albicans*. It is important to note that compared to Ca(OH)_2 , its antimicrobial efficacy was superior. The ODD-M hydrogel could be a good candidate to be used as an intracanal medication because it had a good antimicrobial effect in the strains that were evaluated in this study, however, complementary studies should be carried out prior to its use *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal del tratamiento endodóntico es reducir o eliminar los microorganismos presentes en el sistema de conductos por medio de la limpieza químico-mecánica, sin embargo, es difícil lograr la completa eliminación de las bacterias. Las infecciones dentro del sistema de conductos pueden provocar la inflamación de los tejidos periapicales, lo cual clínicamente se observa como lesiones radiolúcidas^{1, 2}.

Un punto a considerar es que las bacterias dentro de los tubulillos dentinarios están protegidas de los efectos de las células de defensa del huésped, moléculas, antibióticos administrados sistémicamente y de la preparación químico-mecánica. Se requieren tratamientos estratégicos dirigidos a eliminar la infección dentro de los tubulillos dentinarios y deben incluir medicamentos que penetren los tubulillos y eliminen las bacterias².

Se recomienda el uso de una medicación intraconducto para ayudar a la eliminación de estas bacterias e incrementar la posibilidad del éxito clínico³. El estándar de oro de la medicación intraconducto es el Hidróxido de Calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, el cual fue introducido al área odontológica por Herman en 1920¹⁻³. El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ha sido objeto de diversos estudios, sin embargo, hasta la fecha sigue siendo cuestionable la eficacia antimicrobiana que presenta, por lo cual se requieren agentes seguros con mecanismos de acción y propiedades físicas adecuadas que presenten actividad antimicrobiana para ser utilizados como medicación intraconducto⁴.

El ajo ha desempeñado un papel importante en la medicina a través de la historia. Varios experimentos e investigaciones clínicas han sugerido que presenta diversos efectos favorables, entre ellos la reducción de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, reduce el riesgo de cáncer, puede regular los niveles de azúcar en sangre, es antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antifúngico, antiparasítico, antiviral, es hepatoprotector, y presenta efectos benéficos en el sistema inmunológico⁵⁻⁸.

El principal componente antimicrobiano del ajo es un compuesto de azufre oxigenado, llamado Alicina, la cual no está presente en el ajo crudo, esta se forma rápidamente al momento de ser triturado el ajo mediante la acción de la enzima Alinasa sobre la Aliina⁶⁻¹¹.

Su principal mecanismo de acción antimicrobiano es a través de la interacción con las enzimas que contienen el grupo tiol como cisteína proteasas y alcohol deshidrogenasas^{6,8}.

La estructura química de la alicina surgió en 1947, cuando se demostró que podía ser sintetizada mediante la oxidación media del dialil disulfuro, sin embargo, la molécula no era estable¹¹. Entre los años 2000-2005 un grupo de investigadores mexicanos lograron estabilizar el Dialil Óxido de Disulfuro Modificado (ODD-M)¹².

Es importante contar con nuevos agentes terapéuticos biocompatibles y antimicrobianos eficaces que puedan cumplir los objetivos de limpieza y desinfección del sistema de conductos. Existen reportes en la literatura de la eficacia antimicrobiana del óxido dialil disulfuro en bacterias orales, sin embargo, a la fecha no existen estudios que comparen ODD-M con el Ca(OH)_2 que es considerado el estándar de oro de la medicación intraconducto.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Invasión bacteriana de la pulpa

Los microorganismos pueden llegar a invadir la pulpa a través de lesiones cariosas profundas, fisuras o fracturas, a través de los vasos sanguíneos periapicales, caries a nivel del cuello, bolsas periodontales y bacteriemias, entre otras^{13,14}. Kakehashi y *cols.*¹⁶ demostraron que la invasión bacteriana puede llegar a producir necrosis pulpar¹⁵ e infección desencadenando una reacción de defensa por parte del huésped en tejidos periapicales previniendo la diseminación de los microorganismos. En estos casos está indicado realizar un tratamiento de conductos, el cual tiene como objetivo eliminar los microorganismos a través de la preparación químico mecánica del sistema de conductos y prevenir su reinfección^{14,16-19}.

2.2. Biofilm

El biofilm es una comunidad de células microbianas unidas irreversiblemente a un sustrato sólido e inmersas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares formada por exopolisacáridos, proteínas, sales y material celular en solución acuosa, en la matriz se forman canales por donde circula el agua, enzimas, nutrientes y residuos, representa el 85% del volumen del biofilm²⁰⁻²³.

2.2.1. Formación de Biofilm

El proceso de formación de un biofilm comprende cuatro etapas²⁴:

1. Adhesión: consta de 2 etapas:
 - Adhesión inicial reversible, los patógenos en estado planctónico se unen a las proteínas (fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, etc.) de la matriz extracelular presentes en la superficie que van a colonizar, además se adhieren mecánicamente por medio de fimbrias, pilis y flagelos.
 - Adhesión irreversible, tiene lugar cuando se produce una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

2. Acumulación: consiste en la proliferación de las bacterias unidas a la superficie y la producción de matriz.
3. Maduración: en este proceso influyen factores como secreción de toxinas, adhesión célula a célula, factores ambientales, quórum sensing, regulación metabólica, respuesta al estrés, resistencia y virulencia. Mientras más maduro sea un biofilm, aumenta su resistencia a los agentes antimicrobianos.
4. Separación: se puede presentar como respuesta a alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, fluctuaciones en los niveles de oxígeno y el incremento de productos tóxicos. Las bacterias que se separan tienen la capacidad de formar nuevamente biofilm en un ambiente con las condiciones adecuadas.

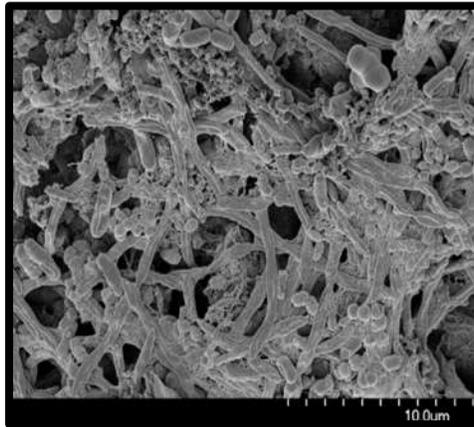


Figura 1. Biofilm dentro del conducto radicular (Haapasalo y cols. 2007)²⁵.

2.2.2. Quórum Sensing.

Es un proceso de comunicación célula-célula bacteriana por medio del cual coordinan la formación del biofilm para funcionar como un sistema multicelular basado en la densidad poblacional bacteriana, a través de la producción y detección de moléculas de señalización denominadas autoinductores^{22,24}.

Algunas de las actividades de los microorganismos reguladas por mecanismos de quórum sensing son: adquisición de nutrientes, conjugación, transformación, síntesis de los factores de virulencia, incorporación extracelular de ADN, colonización, resistencia a antibióticos, motilidad, esporulación, regulación del

estado de bacteria viable pero no cultivable, formación de biofilm y modificación del estado inmunitario del huésped^{22,26}.

Las bacterias dentro del biofilm tienen ciertas ventajas como la creación de nichos para la supervivencia de diferentes especies, aumento de la eficiencia metabólica, protección contra la respuesta de defensa del huésped, son de 1000-1500 veces más resistentes a agentes antimicrobianos^{20,21}.

Los conductos radiculares con pulpa necrótica representan un espacio propicio para la formación de biofilm debido a la presencia de superficies sólidas, un entorno húmedo, microorganismos provenientes de la cavidad oral y un medio fluido que provee de nutrientes.

2.2.3. Biofilm Extrarradicular

Es la biopelícula que se forma en la superficie de la raíz adyacente al ápice de dientes infectados endodóticamente. Dentro de las especies asociadas al biofilm extrarradicular se encuentran *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromona gingivalis* y *Tanerella forsythensis*²³. Este tipo de biofilm se ha reportado en dientes con periodontitis apical asintomática, así como en dientes con abscesos apicales crónicos asociados a un tracto fistuloso. Algunos estudios han reportado que la porción apical de la raíz adyacente al foramen apical puede estar cubierta por placa bacteriana densa embebida en matriz extracelular que además está recubierta por una estructura lisa, la cual se considera está formada por productos de desecho bacteriano y componentes inflamatorios locales. Esto sugiere que los mecanismos de defensa del huésped son incapaces de contener los microorganismos dentro del conducto y tales estructuras con microorganismos incrustados fuera del foramen apical no pueden ser eliminados por los procedimientos endodóuticos convencionales ni por la administración de antibióticos sistémicos. En las irregularidades de la superficie radicular se ha observado que las bacterias se mantienen unidas por la matriz extracelular^{23,27}.

2.2.4. Biofilm Periapical

El biofilm periapical consiste en el establecimiento de microorganismos en los tejidos periapicales, ya sea por adherencia a la superficie apical de la raíz en forma de estructuras similares al biofilm o dentro de la lesión inflamatoria, usualmente como colonias cohesivas. Es un tipo de biofilm aislado que se encuentra en la región periapical de dientes tratados endodónticamente, que pueden observarse incluso en ausencia de infección del conducto radicular. Los microorganismos asociados a la periodontitis apical provienen del conducto, la mayoría de las especies microbianas son patógenos oportunistas que no tienen la capacidad de sobrevivir a la respuesta del huésped en los tejidos periapicales, sin embargo, algunas especies microbianas o incluso cepas de una especie poseen estrategias para sobrevivir e infectar los tejidos periapicales. Miembros del género *Actinomyces* y *Propionobacterium propionicum* son las principales bacterias encontradas en este tipo de biofilm^{23,27}.

2.3. Periodontitis Apical

La periodontitis apical es una condición caracterizada por la inflamación y la destrucción de los tejidos periapicales causada por agentes etiológicos de origen endodóntico, puede ser aguda y sintomática o crónica y mínimamente sintomática o asintomática. La infección del sistema de conductos se ha establecido como la causa principal de este padecimiento además la periodontitis apical que persiste después de un tratamiento endodóntico tiene una etiología más compleja^{4,20,21}.

El grado de inflamación periapical y los síntomas dependen de la cantidad de células microbianas en el sistema de conductos y su virulencia, así como la respuesta del huésped. Las bacterias son los principales organismos que causan periodontitis apical sin embargo también se pueden encontrar hongos y virus^{4,21}, algunos de estos microorganismos se muestran en la tabla 1.

La reacción inflamatoria provocada por los microorganismos restringe la circulación sanguínea en la pulpa y debilita su capacidad de respuesta ante una agresión, lo cual lleva a un daño pulpar irreversible y necrosis pulpar⁴.

La invasión bacteriana de los tubulillos dentinarios ocurre en el 50-90% de los dientes con periodontitis apical. La habilidad de diferentes especies para invadir la dentina demuestra que especies como cocos facultativos Gram positivos, lactobacilos y actinomyces son los invasores más frecuentemente encontrados entre otras especies bacterianas²⁰.

La persistencia de la enfermedad periapical comúnmente está asociada a dificultades durante el tratamiento de conductos como un inadecuado control aséptico, un acceso deficiente, conductos no instrumentados, instrumentación deficiente, filtración de la restauración temporal o permanente²⁰.

Los factores que pueden contribuir a la persistencia de una lesión periapical son la existencia de infección intrarradicular, infección extrarradicular, reacción a cuerpo extraño, presencia de quistes y curación a través de tejido cicatricial fibroso.

Tabla 1: PRINCIPALES ESPECIES BACTERIANAS ENCONTRADAS EN INFECCIONES ENDODÓNTICAS

<p>Infecciones intrarradicales primarias</p>	<p><i>Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Prevotella tannerae, Prevotella baroniae, Prevotella denticola, Porphyromona endodontalis, P. gingivalis, Tanerella forsythia, Dialister pneumosintes, Dialister invisus, F. nucleatum, Treponema denticola, Treponema sokranskii, Pseudoaeromonas alactolyticus, Filifactor alocis, Actinomyces spp, P. propionicum, Olsenella uli, Peptostreptococcus micra, Streptococcus oralis, Streptococcus mitis, Streptococcus sanguis, Campylobacter rectus, Campylobacter gracilis, Cantonella morbi, Veillonella parvula, Eikenella corrodens, Centipeda periodontii, Granulicatella adiacens, Gemella morbillorum, Capnocytophaga spp.</i></p>
<p>Infecciones intrarradicales secundarias/persistentes</p>	<p><i>Propionibacterium acnes, P. propionicum, Actinomyces naeslundii, Actinomyces odontolyticus, P. intermedia, Anaerococcus prevotii, Eggertella lenta, Enterococcus faecalis, G. morbillorum, P. micra, P. alactolyticus, S. mitis, F. nucleatum, Candida albicans</i></p>

Bacterias en conductos obturados	<i>F. nucleatum</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>C. rectus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus angiosus</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>P. micra</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>O. uli</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Staphylococcus</i> .
Bacterias en retratamientos endodónticos	<i>E. faecalis</i> , <i>P. alactolyticus</i> , <i>P. propionicum</i> , <i>F. alocis</i> , <i>D. pneumosintes</i> , <i>D. invisus</i> .
Infecciones extrarradiculares	<i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>A. israelii</i> , <i>P. acnes</i> , <i>P. propionicum</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>P. micra</i> , <i>F. nucleatum</i> .

Tomado de: Siqueira, 2009 ²⁸

2.4. *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son células esféricas u ovoides, crecen en pares o cadenas cortas en medios líquidos, no forman endoesporas y algunas especies presentan movilidad por la presencia de flagelos escasos. Forman colonias blancas cremosas como se muestra en la figura 2, son Gram positivos, catalasa negativos capaces de crecer en Cloruro de Sodio (NaCl) al 6.5%, en rangos de temperatura de los 10-45°C y pueden sobrevivir 30 minutos a 60°C y a un pH por encima de 9.6. La mayoría de los enterococos son aerobios facultativos pero algunas especies son anaerobios estrictos, son especies ubicuas y potencialmente patógenas que tienen la capacidad de adquirir resistencia o tolerancia fenotípica a varios desinfectantes o agentes físicos²⁹.

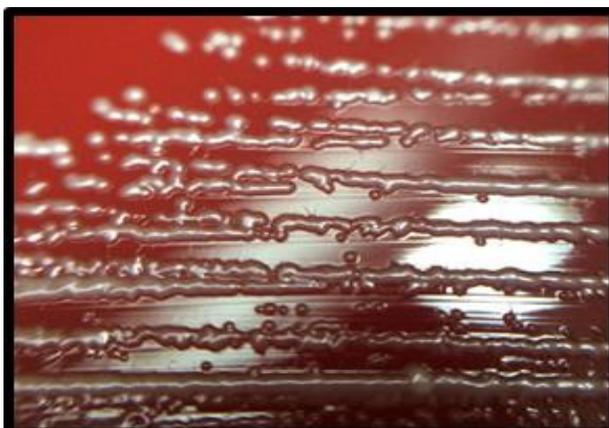


Figura 2. Crecimiento bacteriano de *E. faecalis* en medio de cultivo (fuente propia).

E. faecalis es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, es un microorganismo del tracto intestinal que puede habitar en la cavidad oral y el surco gingival, en el intestino contribuye con el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y vitaminas, también se puede encontrar en el agua y alimentos. Dentro de la cavidad oral tiene la capacidad de invadir los tubulillos dentinarios, penetrando a una profundidad de 50-300 μm y se adhiere a la dentina, tiene alta resistencia al estrés alcalino y puede requerir de la función de la bomba de protones para sobrevivir en un ambiente alcalino, además puede afectar la respuesta inflamatoria. Sin embargo, puede estar presente en conductos infectados sin periodontitis apical visible²⁹.

Además, posee factores de virulencia que le permiten adherirse a las células del huésped y matriz extracelular, facilitan la invasión de los tejidos, afectan la inmunomodulación, producen daño mediado por toxinas. Entre estos factores se encuentran^{29,30}:

- Sustancia de agregación
- Adhesinas de superficie
- Gelatinasa
- Hialuronidasa
- Ácido lipoteicoico
- Feromonas sexuales
- Citolisina
- Hemolisina
- Producción de superóxido extracelular
- Resistencia a determinados antibióticos
- Polisacáridos capsulares

E. faecalis cuenta con características singulares que lo hacen un sobreviviente excepcional, puede vivir y persistir en dientes tratados endodónticamente con un ambiente pobre en nutrientes, sobrevive en presencia de varios medicamentos, hipoclorito de sodio (NaOCl), clindamicina y la medicación más popular de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y en ambientes extremos con bajo pH, alta salinidad y altas temperaturas, forma biofilm en conductos medicados, invade y metaboliza fluidos dentro de los tubulillos dentinarios, se adhiere al colágeno en presencia de suero humano, puede convertirse a un estado viable pero no cultivable (VBNC), resiste periodos prolongados de inanición y utiliza el líquido crevicular para recuperarse, establece

monoinfecciones en conductos medicados, adquiere resistencia antibiótica por codificación de genes combinada con la resistencia natural a varios agentes antimicrobianos^{1,20}.

El desarrollo del biofilm de *E. faecalis* consta de 3 etapas²³:

1. Se adhiere en la superficie dentinaria del conducto.
2. La disolución de la fracción mineral del sustrato dentinario por las bacterias conduce al aumento de iones Calcio y Fosfato provocando la mineralización del biofilm.
3. El biofilm de *E. faecalis* se mineraliza por la interacción de las bacterias con sus productos de desecho sobre la dentina.

E. faecalis es el microorganismo que se encuentra más frecuentemente en las infecciones post-tratamiento y el más utilizado en investigaciones relacionadas con la endodoncia.

Resultados microbiológicos han demostrado que la persistencia de enfermedad periapical tiene una alta prevalencia de enterococos en un rango del 29 al 77%. En conductos no tratados los enterococos constituyen únicamente alrededor del 5% o menos de la microflora. Lo cual lleva a cuestionar como y cuando los enterococos invaden el sistema de conductos. Se puede hipotetizar que *E. faecalis* puede estar presente en conductos no tratados en cantidades bajas por lo cual no es recuperable. Debido a los cambios en el ambiente del conducto este microorganismo puede crecer en altas proporciones recuperables. Otra explicación podría ser que *E. faecalis* entra a los conductos durante o entre el tratamiento endodóntico^{20,31}.

2.5. Medicación Intraconducto

Es aquella sustancia o medicamento que se utiliza entre las sesiones del tratamiento endodóntico y es colocado dentro de los conductos radiculares después de prepararlos biomecánicamente, con la finalidad de eliminar la infección endodóntica y evitar la proliferación microbiana en el sistema de conductos, eliminar o destruir cualquier remanente bacteriano viable en el sistema de conductos que no haya sido

destruido por la preparación químico mecánica, neutralizar las endotoxinas bacterianas en dientes con necrosis pulpar y periodontitis apical, reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria apical y por lo tanto disminuir el dolor, ayuda a eliminar el exudado apical si está presente además debe actuar como barrera física y química previniendo la reinfección de los conductos y minimizar la microfiltración a través de la restauración temporal³².

Las bacterias pueden sobrevivir después de haber colocado la medicación intraconducto debido a varios factores²:

- Las bacterias dentro del conducto pueden presentar resistencia intrínseca al medicamento y estar localizadas en zonas inaccesibles al medicamento.
- El medicamento puede ser neutralizado por los componentes del tejido, las bacterias o sus productos, perdiendo su efecto antibacteriano.
- Los medicamentos pueden permanecer en el conducto por un periodo de tiempo insuficiente para alcanzar y eliminar las bacterias.
- Las bacterias pueden alterar los patrones de expresión de los genes después de algún cambio en el ambiente, lo cual les permite sobrevivir en ambientes desfavorables.

El uso de una medicación intraconducto altera las interrelaciones nutricionales establecidas eliminando algunas bacterias que podrían ser necesarias para el crecimiento de otras, o dejar algunas bacterias que cuya presencia previene el crecimiento de otras³³.

2.5.1. Tipos de Medicación Intraconducto

Se han empleado diferentes sustancias antimicrobianas como medicación intraconducto¹:

- Ca(OH)_2
- Antibióticos (Pasta triantibiótica, Clindamicina).

- Biocidas no fenólicos (alcoholes, aldehídos, biguanidas, compuestos de amonio cuaternario).
- Biocidas fenólicos (eugenol, paramonoclorofenol alcanforado, paramonoclorofenol, cresatina).
- Compuestos del Yodo (yodo yoduro de potasio).

2.5.1.1. Hidróxido de Calcio

El primer registro que se tiene en la literatura sobre el uso del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es de Nygren en 1838 quien lo utilizó para el tratamiento de “*fistula dentalis*”, posteriormente Codman lo empleó para tratar la pulpa dañada³⁴, pero fue hasta 1920 que se introdujo formalmente al campo odontológico por Herman, desde entonces se ha utilizado para diferentes procedimientos como recubrimiento pulpar directo e indirecto, apicogénesis, apexificación, tratamiento de reabsorciones radiculares, perforaciones radiculares iatrogénicas, fracturas radiculares, reimplantación de dientes y medicación intraconducto^{1-3, 33}.

El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es un polvo sin olor, tiene un peso molecular de 74.08, presenta baja solubilidad en agua la cual disminuye al aumentar la temperatura. El coeficiente de disociación del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($\alpha=0.17$) permite una lenta y controlada liberación de iones Calcio (Ca^+) e Hidroxilo (OH^-) (figura 3), su pH es de 12.5-12.8, es insoluble en alcohol y una base fuerte³. Se le han atribuido propiedades biológicas como: actividad antimicrobiana, capacidad para disolver tejido e induce la reparación mediante la formación de tejido duro. Es considerado una de las medicaciones más efectivas en el tratamiento endodóntico a nivel mundial^{1,2}.

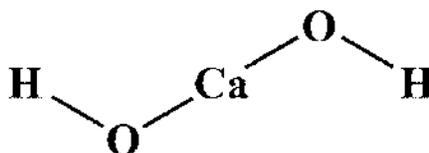


Figura 3. Fórmula química $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Mecanismo de Acción.

Este depende de la liberación de iones OH^- en un ambiente acuoso, los efectos letales que ejerce sobre las bacterias se deben principalmente a los siguientes mecanismos³:

1) Daño a la membrana citoplasmática de la bacteria.

Los iones OH^- inducen peroxidación lipídica destruyendo los fosfolípidos de la membrana celular, también remueven átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados generando radicales lipídicos que reaccionan con el oxígeno y producen radicales peroxilípidos, los cuales inician una reacción autocatalítica en cadena generando nuevas pérdidas, produciendo así daño a la membrana citoplasmática^{1-3,33}.

2) Desnaturalización de proteínas.

El medio alcalino que provee el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ induce el rompimiento de los enlaces iónicos que mantienen la estructura terciaria de las proteínas, dando como resultado la pérdida de la actividad biológica de las enzimas e interrupción del metabolismo celular. Las proteínas estructurales también se ven afectadas por los iones OH^- ^{1-3,33}.

3) Daño al ADN.

Los iones OH^- reaccionan con el ADN bacteriano inhibiendo su replicación, también pueden inducir mutaciones letales. La capacidad del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de absorber dióxido de carbono (CO_2) puede contribuir a su actividad antibacteriana, impidiendo el suministro de CO_2 a las bacterias^{1-3,33}.

En la literatura se ha reportado que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puede ser mezclado con diferentes vehículos para formar la pasta que se coloca dentro de los conductos^{35,36}, algunos de ellos se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2: Tipos de vehículos utilizados en la elaboración de la pasta de Ca(OH)₂

ACUOSOS	VISCOSOS	OLEOSOS
<ul style="list-style-type: none"> ○ Agua destilada ○ Solución salina ○ Anestesia ○ Solución ringer ○ Metilcelulosa ○ Carboximetilcelulosa ○ Soluciones aniónicas ○ detergentes ○ Clorhexidina 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Polietilenglicol ○ Propilenglicol ○ Glicerina 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aceite de oliva ○ Aceite de silicona ○ Metacrecilacetato ○ Eugenol ○ Ácido oleico ○ Ácido linoleico ○ Alcanfor

Siqueira y cols. 1999, Athanassiadis y cols. 2007, Ballal y cols. 2010, Mohammadi 2011, Pacios y cols. 2012.

El Ca(OH)₂ actúa como barrera física al ocupar el espacio dentro del conducto previniendo el ingreso de bacterias a los conductos, de manera que elimina los microorganismos remanentes, mediante la retención de sustratos y limita el espacio para su multiplicación^{1,2}.

Los efectos antibacterianos se presentan mientras se mantenga un pH alto, se ha demostrado que la aplicación de Ca(OH)₂ por 7 días es suficiente para reducir las bacterias a un nivel que dé cultivos negativos^{2,3}.

Algunas de las propiedades biológicas con las que cuenta el Ca(OH)₂ son la biocompatibilidad que tiene debido a la baja solubilidad en agua y difusión limitada que presenta, además, tiene la habilidad de promover la reparación de los tejidos alrededor del diente con conductos infectados, tiene la capacidad de inhibir la resorción radicular y estimular la reparación periapical después de un traumatismo¹.

2.5.1.2. Clorhexidina.

El digluconato de clorhexidina (CHX) es una base biguanida fuerte con carga positiva, hidrofóbica y lipofílica, es un antiséptico catiónico con amplio espectro antibacteriano, su fórmula química (figura 4), es C₂₂Cl₂N₁₀H₃₀^{1,37,38}, es prácticamente insoluble en agua, su actividad depende del pH del ambiente y su

valor óptimo es de 5.5-7, esta disminuye en presencia de sangre, suero, pus y materia orgánica, jabones y compuestos aniónicos³⁸.

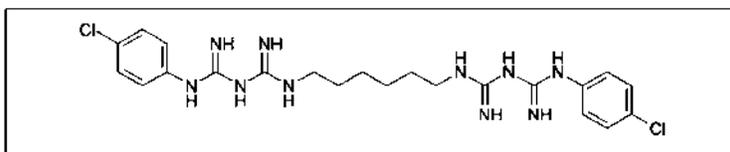


Figura 4. Estructura química de la Clorhexidina.

La CHX presenta^{37,38}:

1. Acción bacteriostática a bajas concentraciones. A través de la alteración del balance osmótico de la bacteria, promueve la liberación de moléculas de bajo peso molecular.
2. Acción bactericida a altas concentraciones. Provoca muerte celular a través de citólisis ya que aumenta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana liberando los principales componentes intracelulares, de este modo altera la estructura de las proteínas y provoca la precipitación/coagulación de las proteínas.

Actividad Antimicrobiana.

La CHX es efectiva contra bacterias Gram positivas, hongos y algunos virus. En estudios *ex vivo* ha demostrado ser efectiva contra *A. israelii* y *E. faecalis* en conductos radiculares infectados. *In vitro* es efectiva contra patógenos endodónticos como *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *C. albicans*, en esta última inhibe la filamentación y disminuye la adhesión de las levaduras a las células epiteliales. También es efectiva contra periodontopatógenos como *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomyces actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*^{33,34}. Además inactiva virus lipofílicos como herpes simple, VIH, virus de la influenza y citomegalovirus³⁸.

Efecto de Sustantividad.

La CHX posee sustantividad antibacteriana debido a la liberación de iones con carga positiva, estos pueden ser absorbidos por la dentina y prevenir la colonización microbiana en la superficie dentinaria durante algún tiempo más allá del tiempo real de aplicación del medicamento. La sustantividad microbiana depende del número de moléculas de CHX disponibles para interactuar con la dentina y su efecto puede durar hasta 12 semanas^{37,39}.

Usos y Aplicaciones de CHX^{37,38}:

- En cirugía general, en solución acuosa para la antisepsia quirúrgica del paciente y del operador.
- En cirugía oral, en gel y enjuague bucal para el control de placa antes y después del procedimiento.
- Cirugía de terceros molares, en gel 0.2% para prevenir alveolitis.
- Tratamiento para la Candidiasis oral.
- Irrigación de conductos radiculares.
- Medicación intraconducto.
- Preparación preoperatoria de piel (disminuye la tasa de infección del sitio).
- Aplicación tópica en el cordón umbilical (reduce mortalidad neonatal).
- Reducción de inflamación gingival, índices de placa y sangrado.
- Tratar halitosis.

La CHX ha sido utilizada por más de 40 años en la práctica dental, principalmente como enjuague bucal antibacterial ya que reduce significativamente la gingivitis y los índices de placa y sangrado gingival³⁷.

Al utilizarla por más de dos semanas en tratamientos dentales produce alteraciones transitorias como pigmentación temporal de color café oscuro en dientes, lengua y

restauraciones de ionómero de vidrio y resina además de irritación de la mucosa y alteraciones en los sabores^{37,38}.

En el área endodóntica ha sido empleada como irrigante por su actividad antimicrobiana y ha emergido como medicación intraconducto ya que puede actuar como bactericida o bacteriostático dependiendo de la concentración a la cual sea utilizada, presenta sustentividad, su biocompatibilidad es aceptable y raramente puede provocar reacciones alérgicas^{1,39-41}.

Su efecto sobre biofilms es significativamente menor que el NaOCl³⁶. Puede inhibir la adherencia de algunas bacterias, tiene la capacidad de alterar la pared celular y penetrar, produciendo efectos intracelulares tóxicos^{1,37,38}.

Las formulaciones en gel son menos tóxicas para los tejidos periapicales, al ser viscoso se mantiene el agente activo en contacto con las paredes del conducto y los tubulillos dentinarios y no interfiere con las propiedades de los materiales de obturación, sin embargo, no disuelve tejido orgánico¹.

2.5.1.3. Pasta Triantibiótica.

La pasta triantibiótica (TAP) es la medicación intraconducto más utilizada para desinfectar los conductos en procedimientos regenerativos, tiene la capacidad de difundirse a través de los conductos radiculares hasta la zona periapical y ejercer su acción bactericida. Los procedimientos regenerativos están basados biológicamente en procedimientos planeados para reemplazar tejidos dañados, incluyendo la dentina y estructuras radiculares, así como las células del complejo dentino pulpar. En casos de dientes inmaduros con ápices abiertos y pulpas necróticas los procedimientos regenerativos promueven el desarrollo de la raíz y el cierre apical⁴²⁻⁴⁴.

La pasta triantibiótica está compuesta principalmente por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina⁴³⁻⁴⁵.

El metronidazol pertenece al grupo de los nitroimidazoles, es utilizado debido a su amplio espectro y por su actividad antibacteriana contra cocos anaerobios, así como

bacilos Gram negativos y Gram positivos, penetra las membranas de las bacterias, alcanza el núcleo y se une al ADN destruyendo su estructura helicoidal y por lo tanto produce la muerte celular. Su uso ha sido recomendado debido a su baja inducción de resistencia bacteriana^{43,45}.

La minociclina es un derivado sintético de la tetraciclina, es efectiva contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluyendo espiroquetas y bacterias anaerobias facultativas invade las bacterias por difusión pasiva a través de la capa externa de la membrana seguida de transporte activo a través de la membrana interna, alcanzando las superficies de los ribosomas e inhibiendo la síntesis de proteínas^{43,45}.

La fluoroquinolona sintética ciprofloxacina tiene una actividad muy potente contra los patógenos Gram negativos, pero su actividad es limitada contra bacterias Gram positivas y la mayoría de las bacterias anaeróbicas son resistentes a la ciprofloxacina. Actúa inhibiendo la ADN girasa en núcleos bacterianos, degradando el ADN por exonucleasas, dando como resultado un efecto bactericida. A menudo se combina con metronidazol en el tratamiento de infecciones mixtas. Aunque puede causar efectos secundarios, en dosis bajas, el medicamento es clínicamente seguro. Se puede suponer que cuando se aplican dosis bajas de ciprofloxacina como un medicamento intraconducto, se producen efectos secundarios generales adversos insignificantes^{43,45}.

El inconveniente de utilizar la pasta triantibiótica es que puede producir resistencia bacteriana, además de que la minociclina puede causar decoloración dental^{42,45}.

Algunos estudios han demostrado la eficacia antimicrobiana de la pasta triantibiótica como el realizado por Adl y cols.⁴⁴ donde reportan que la pasta triantibiótica es efectiva para eliminar *E. faecalis* además de que esta pasta tiene la capacidad de penetrar los tubulillos dentinarios hasta 200µm y reducir la carga bacteriana, además Sabrah y cols.⁴⁶ mencionan que la pasta triple antibiótica disminuye efectivamente la formación de biofilm de *E. faecalis* y *P. gingivalis*. Por otra parte, Pallotta y cols.⁴⁷ reportan que la mezcla de ciprofloxacino, Flagyl (metronidazol) e

hidróxido calcio (CFC) es efectiva para eliminar *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* y *Bacteroides fragilis*.

Recientemente Karczewski y cols.⁴⁸ sintetizaron nano fibras poliméricas con Clindamicina y pasta triantibiótica modificada con Clindamicina, realizaron pruebas de sensibilidad en cepas ATCC de *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, y midieron los halos de inhibición. Ambas fibras inhibieron el crecimiento de todas las especies evaluadas. Determinan que la razón fundamental para utilizar nano fibras que contienen antibióticos biodegradables como un dispositivo intraconducto 3D es la liberación localizada de los agentes antimicrobianos a una concentración mucho menor y de manera predecible en las paredes de la dentina, además los resultados obtenidos muestran el potencial clínico en la endodoncia regenerativa basado en la significativa eficacia antimicrobiana, baja toxicidad y que no pigmentan los tejidos.

2.5.1.4. Clindamicina.

Los antibióticos son sustancias de origen natural, sintéticas o semisintéticas que actúan inhibiendo microorganismos a una dilución elevada y ejercen su acción molecular en un proceso metabólico o en una estructura concreta de un microorganismo⁴⁹.

La clindamicina es un derivado semisintético de la lincomicina, un antibiótico natural producido por la actinobacteria *Streptomyces lincolnensis*⁵⁰, por lo cual pertenece al grupo de las lincosamidas^{45,51}, es un derivado de un aminoácido, el ácido trans-1-4-n-propilhigrinico, unido a un derivado de una octosa que contiene azufre⁴⁹.

Es un antibiótico de amplio espectro con un alto nivel de actividad contra bacterias anaerobias Gram positivas y negativas, cocos Gram positivos y protozoarios⁵¹⁻⁵³. La clindamicina en presentación de gel al 1% está indicado en el tratamiento auxiliar del acné vulgaris^{50,51}.

Se une exclusivamente a la subunidad 50s de los ribosomas bacterianos y suprime la síntesis de proteínas, potencializa la opsonización y fagocitosis bacteriana incluso a concentraciones subinhibitorias^{49, 51-53}.

La clindamicina se ha utilizado por más de 30 años por todo el mundo para tratar infecciones de cabeza y cuello, respiratorias, óseas, de tejidos blandos, pélvicas y abdominales, además como profilaxis para la endocarditis^{42,53}.

Brook y cols.⁵² mencionan que la clindamicina se ha empleado como antibiótico de primera opción en el tratamiento de infecciones odontogénicas leves o moderadas, sin embargo, se debe tener en cuenta que la naturaleza polimicrobiana de las infecciones dentales y la resistencia bacteriana a los antibióticos se convierten en un desafío al momento de tratarlas.

Existen pocos registros de su uso en el área endodóntica como medicación intraconducto, en el año de 1990 Molander y cols.⁵⁴ reportan un estudio *in vivo* utilizando el polvo de una capsula de 150 mg de clindamicina mezclada con solución salina, la cual colocaron como medicación intraconducto durante 14 días, sin embargo, determinaron que no presenta alguna ventaja sobre la medicación intraconducto convencional de Ca(OH)₂ y, por lo tanto, no recomendaban su uso en el tratamiento de conductos. Gilad y cols.⁵⁵ desarrollaron fibras de vinil-acetato de etileno (EVA) impregnadas con clindamicina, las cuales eliminaron efectivamente cepas de *P. intermedia*, sin embargo, fueron menos efectivas contra *F. nucleatum* y presentaron efecto nulo sobre *P. micros*. Por otra parte, Rector y cols.⁵⁶ realizaron un estudio *in vitro* en el cual determinaron que la clindamicina gel 1% es un fármaco efectivo en la inhibición de bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P intermedia* y *T. forsythia*.

Recientemente investigadores desarrollaron nano fibras poliméricas impregnadas con clindamicina que se utilizaron como medicación intraconducto, estas fibras eliminaron efectivamente *A. naeslundii*⁴⁸.

2.6. Soluciones de Superoxidación (SSO).

Las SSO son soluciones acuosas procesadas electroquímicamente, fabricadas a partir de agua pura, durante la electrólisis, las moléculas de agua se rompen, con la consecuente formación de iones y radicales libres, si se adiciona cloruro de sodio (NaCl) grado biológico, también se disocia dando como resultado especies altamente reactivas⁵⁷.

Para su elaboración son tratadas en una cámara con dos electrodos, uno positivo o ánodo y uno negativo o cátodo, a la cual se le induce corriente eléctrica de 9 volts, generando diversos elementos, principalmente derivados de Cloro (Cl^-), Hidrogeno (H^+) y Oxígeno (O^-). El NaCl en el agua se disocia en Cl^- cargado negativamente, así como en sodio (Na^+) e H^+ cargados positivamente. Los iones OH^- y Cl^- son absorbidos por el ánodo, mientras liberan un electrón para transformarse en radicales y se combinan formando ácido hipocloroso (HClO) principalmente, además de ion de ácido hipocloroso (HClO), clorina (Cl_2), hidróxido (OH) y ozono (O_3), los cuales son efectivos para inactivar algunos microorganismos. Después de este proceso de electrólisis se obtiene una solución incolora, ácida, con un alto potencial de oxidorreducción (ORP) y con una variedad de iones que pueden ser útiles clínicamente^{58,59}.

Especies químicas presentes en SSO⁵⁷:

- Ácido hipocloroso (HClO)
- Cloro libre en ppm (Cl_2)
- Ozono (O_3)
- Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)
- Cloruro de sodio (NaCl)

De acuerdo al pH que presenten las SSO se pueden clasificar como ácidos fuertes o de pH bajo, se preparan con soluciones de NaCl y se electrólizan, los ácidos débiles o de pH alto se obtienen por la electrólisis de soluciones con más altas

concentraciones de NaCl, este tipo de SSO son microbicidas activos debido a la alta cantidad de cloro libre activo, el cual es superior a 650 ppm, son altamente corrosivas e inestables. Las SSO de pH alcalino (>9) tienen propiedades microbicidas pero su efectividad es más limitada ya que la presencia de cloro esta disminuida^{57,59}. Estos productos farmacéuticos, se comercializan en presentaciones de solución e hidrogel.

Mecanismo de Acción

Se relaciona con el efecto de oxidación de los grupos sulfhidrilos (-SF) y disulfuro (SS) de los aminoácidos de la pared bacteriana y en los virus hay alteración de la cápside, lo que inactiva las enzimas de las bacterias y virus alterando los procesos de respiración y nutrición de los gérmenes, además existe oxidación de los componentes respiratorios, inhibición de la síntesis de proteínas, ruptura y disminución de la síntesis de ADN, rompimiento de las cadenas de ARN, cloración en el anillo de aminoácidos, alteración del metabolismo bacteriano, viral y fungal disminuyendo drásticamente la producción de ATP^{58,60,61}.

Su mecanismo de acción se debe a que reacciona y desnaturaliza proteínas como la catalasa y la RNAasa. En las bacterias desestabiliza la pared celular por la acción de los radicales libres e iones, su naturaleza hipotónica provoca un choque osmótico en la célula hasta que esta estalla⁵⁷.

Eficacia Antimicrobiana.

Las SSO presentan efecto desinfectante, esterilizante y antiséptico. Su espectro microbicida es amplio y efectivo contra una gran variedad de bacterias (menos de 5 min de contacto), hongos, virus (10 min de contacto) y micobacterias, eliminándolos de manera rápida, poseen baja toxicidad, son de fácil manejo en su almacenamiento, uso y desecho⁵⁹.

Son efectivas contra: *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter sp*, *B. fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. faecalis*, *Enterococcus* resistentes a vancomicina, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*,

Serratia marcescens, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Micobacterium chelonae*, *Mycob6cterium tuberculosis* y *C. albicans*. Destruyen esporas de *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y virus de hepatitis B, poliovirus, norovirus y VIH⁵⁹. Es un producto farmacéutico que se puede encontrar en el mercado en presentación de hidrogel y como solución.

Usos y Aplicaciones de las SSO.

Las SSO se han empleado principalmente para desinfectar equipo endoscópico y de hemodiálisis. La FDA las ha aprobado para tratar diversos problemas clínicos en humanos, como: procesos infecciosos en pie y úlceras, desbridar, lubricar y humectar heridas traumáticas y quemaduras, irrigar el mediastino después de una cirugía a corazón abierto, tratamiento de peritonitis y abscesos intraperitoneales, lavado y desinfección de manos de personal médico^{57,58}.

El primer estudio realizado en México donde se utilizó una SSO fue en necrobiosis de pies diabéticos, no se presentaron efectos colaterales adversos y hubo reducción significativa del olor fétido en las primeras 24 h.

En un segundo estudio utilizaron SSO sobre úlceras venosas crónicas, la mayoría de las úlceras cerraron en los primeros 7 meses de tratamiento mientras que las del grupo control después de un año. Se encontró que su aplicación en estas lesiones pudiera haber acelerado la cicatrización de la mayoría de las úlceras.

En el tercer estudio se utilizó en el tratamiento de quemaduras de 2° y 3er grado, estos pacientes no requirieron de terapia antibiótica, las quemaduras de 3er grado con diámetro de hasta 10 cm sanaron completamente sin requerir injertos de piel, los resultados cosméticos fueron mejores y hubo menos quelación⁵⁷.

Biocompatibilidad.

El HClO que contienen las SSO es una molécula que biológicamente es sintetizada por neutrófilos y macrófagos durante un proceso biológico conocido como estallido respiratorio que tiene lugar como resultado de la fagocitosis⁶².

El uso de las SSO en el área odontológica es limitado debido a que no se han realizado muchas investigaciones sobre ellas, sin embargo, se han reportado resultados favorables como los obtenidos por Stein⁶¹ al utilizar SSO como irrigante en tratamientos de raspados y alisados radiculares con lo cual se disminuyó considerablemente la placa dentobacteriana, se redujo la inflamación gingival y la profundidad de las bolsas periodontales, del mismo modo Flores⁶³ reporta resultados similares utilizando SSO como parte de la terapia periodontal, sin efectos colaterales en su uso, además Mena- Mendivil y cols.⁵⁸ argumentan que las SSO tienen la capacidad para remover el biofilm y podrían ser una posible alternativa como irrigantes intraconducto, sin embargo deben ser probadas clínicamente para poder determinar su efecto antibacterial en los diversos microorganismos que habitan los conductos necróticos.

2.7. Hidrogeles.

Un gel se define como una red tridimensional compuesta de cadenas flexibles, constituida por segmentos conectados de una determinada manera e hinchada por un líquido. Pueden ser de dos tipos dependiendo del líquido que solvata las cadenas, si este es orgánico recibe el nombre de organogel, si es agua se denominan hidrogeles⁶⁴.

Un hidrogel es una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros que son capaces de absorber líquidos (agua o fluidos corporales) sin disolverse y liberarlos con el tiempo. Estos polímeros tienen ciertas características como ser hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua además de que se hinchan en presencia de ella, aumentando su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio físico químico, pueden tener gran resistencia mecánica⁶⁴⁻⁶⁶.

Los hidrogeles se pueden obtener a partir de polímeros naturales, por ejemplo, colágeno, quitosán, fibrina y otros, y sintéticos como: óxido de polietileno, ácido poliacrílico, polivinil pirrolidona y alcohol polivinílico, por medio de procesos físicos y químicos⁶⁵.

2.8. Óxido Dialil Disulfuro Modificado (ODD-M).

El ajo (*Allium sativum*) es una planta que pertenece a la familia Liliáceas es originario de Asia central pero actualmente se puede encontrar en todo el mundo^{5,9}. Contiene más de 2000 sustancias biológicamente activas como compuestos volátiles, compuestos órgano sulfurados solubles en agua y en aceite, aceites esenciales, fibra dietética, 32% de azúcar, flavonoides y pectina¹⁰.

El ajo ha desempeñado un papel importante en la medicina a través de la historia. Varios experimentos e investigaciones clínicas han sugerido que presenta varios efectos favorables, entre ellos la reducción de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, reduce el riesgo de cáncer, puede regular los niveles de azúcar en sangre, es antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antifúngico, antiparasítico, antiviral, mejora la desintoxicación de compuestos extraños y es hepatoprotector, además tiene efectos benéficos en el sistema inmunológico⁵⁻⁸.

Históricamente se cree que, en 1858, Louis Pasteur describió por primera vez el efecto antimicrobiano del ajo sin embargo no existe referencia alguna^{6,7}.

Cavallito y cols.¹¹ en 1944 aislaron e identificaron el componente responsable de la notable actividad antimicrobiana de los dientes de ajo triturados, este compuesto resulto ser azufre oxigenado, el cual ellos nombraron alicina por el nombre en latín de la planta del ajo, *Allium sativum*.

La estructura química de la alicina surgió en 1947, cuando se demostró que podía ser sintetizada mediante la oxidación media del dialil disulfuro, sin embargo, la molécula no era estable¹¹. Entre los años 2000-2005 un grupo de investigadores mexicanos lograron estabilizar el Dialil Óxido de Disulfuro Modificado (ODD-M) agregando un cofactor que no modificaba ni la acción antimicrobiana ni el resto de

acciones de la Alicina, pero si le confería acción a largo plazo, logrando obtener un antimicrobiano/antiséptico por contacto, estable, biodegradable, atóxico y con gran espectro de acción, no solo contra microorganismos Gram negativos y positivos, ya que incluso es activo contra hongos^{12,67}. Este producto se encuentra en el mercado en presentaciones comerciales de hidrogel y solución.

Obtención de la Alicina.

El principal componente antimicrobiano del ajo es un compuesto de azufre oxigenado, llamado Alicina, la cual no está presente en el ajo crudo, esta se forma rápidamente al momento de ser triturado el ajo mediante la acción de la enzima Alinasa sobre la Aliina. Esta reacción se completa en segundos (figura 5), por lo tanto, las moléculas de Alicina obtenidas tienen una vida media corta. La Alicina pura es una molécula volátil, poco miscible en soluciones acuosas, la cual tiene el olor característico del ajo recién triturado, es un potente antibiótico como la penicilina o tetraciclina, por si sola la Alicina es un producto inestable y sufrirá reacciones adicionales para formar otros derivados, dependiendo del ambiente y las condiciones del proceso⁶⁻¹¹.

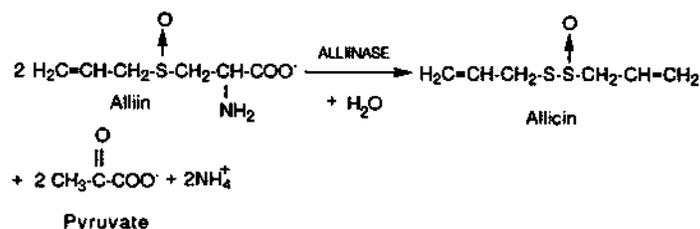


Figura 5. Obtención de la molécula de Alicina en los dientes de ajo (Ankri y Mirelman 1999).

Mecanismo de Acción.

1. Acción sobre el metabolismo microbiano.

La Alicina reacciona rápidamente con grupos tiol libres, a través del intercambio tiol-disulfuro, por lo tanto, su principal mecanismo de acción antimicrobiano es a través de la interacción con las enzimas que contienen tiol como cisteína proteasas, tioredoxina reductasa, RNA polimerasa y alcohol deshidrogenasas. Debido a que

estas enzimas son esenciales para la nutrición y metabolismo bacteriano, se ha sugerido que el desarrollo de resistencia bacteriana a la alicina se presenta 1000 veces menos que con otros antibióticos^{6,8,9,11,12}.

2. Por medio de reacciones de óxido reducción.

Por efecto de enlaces sulfóxidos (SO), creando iones libres que rompen el enlace 1-4 de Mureina de la pared bacteriana, debilitándola ocasionando su ruptura y muerte del microorganismo⁶⁷.

Eficacia Antimicrobiana.

La Alicina, es efectiva contra un gran número de bacterias Gram positivas, Gram negativas y bacterias acidorresistentes, además presenta especificidad antifúngica de amplio espectro, virus y parásitos^{6,9,10}.

Entre ellas están *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus spp*, *Shigela spp*, *Proteus*, *Bacillus*, *S. aureus* resistente a la meticilina^{10,11}.

Estudios *in vitro* han demostrado que el ajo tiene actividad antiviral contra varios tipos de virus incluyendo Cytomegalovirus, virus influenza B, virus del herpes simple tipo1 y tipo 2, virus parainfluenza tipo 3, rinovirus humano tipo 2. también es un buen agente para destruir lombrices en el cuerpo humano mediante la eliminación de parásitos del tracto gastrointestinal¹⁰.

Algunos hongos también son sensibles al ajo entre ellos están *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*. *Epidermophyton* y *Microsporum*, inhibe la geminación de las esporas y el crecimiento de hifas¹¹.

En estudios *in vitro* se ha demostrado el efecto antimicrobiano de diferentes concentraciones de extracto de ajo sobre la microbiota de la placa dental⁷.

Biocompatibilidad.

El ajo tiene actividad inmunorreguladora, este efecto se debe a los compuestos organosulfurados. Los fructanos del ajo añejo han demostrado tener actividad inmunorreguladora *in vitro*. El extracto de ajo es dependiente de la concentración efectiva en la proliferación de IL-2 y en la expresión del gen del interferón (INF- γ) de linfocitos estimulados, también reduce la infección por macrófagos mediante la inducción de la producción de óxido nítrico *in vitro*^{9,68}.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

Bakri y Douglas ⁸ evaluaron el efecto antimicrobiano *in vitro* de Alicina (extracto de ajo) en 19 cepas bacterianas de patógenos orales y una cepa de *C. albicans* NCTC 3091, además, determinaron la actividad proteolítica de la Alicina en la enzima cisteína-proteasa de *P. gingivalis*. Para los ensayos de sensibilidad antimicrobiana estos investigadores utilizaron un extracto de ajo filtrado y esterilizado a una concentración de 57.1% (w/v), el cual contiene aproximadamente 220 µg/ml de Alicina. Esta concentración inhibió el crecimiento de casi todos los microorganismos evaluados en este estudio. El rango de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de Alicina en las cepas bacterianas Gram negativas fue de 0.4-13.7 µg/ml y 13.7-55 µg/ml para bacterias Gram positivas. La MIC en *E. faecalis* aislado endodónticamente fue de 27.5 µg/ml y 3.4 µg/ml para *C. albicans*. La actividad proteolítica de la enzima cisteína-proteasa fue de 94.88% a una concentración de 55 µg/ml de Alicina.

Bachrach y cols.⁶⁹ evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de la Alicina en cepas bacterianas de *A. oris* (ATCC 43146), *Streptococcus mutans* (ATCC 27351), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 6715), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 10953), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523). Utilizaron Alicina al 98% de pureza y realizaron ensayos MIC: 600µg/ml para *S. mutans*, *Actinomyces oris* y *S. sobrinus*, 300 µg/ml para *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*, 2400 µg/ml para *P. gingivalis*. Encontraron que la Alicina fue efectiva en inhibir el crecimiento de todas las bacterias evaluadas. *S. mutans*, *A. oris* y *S. sobrinus* fueron las menos sensibles. *P. gingivalis* presento la mayor resistencia. Además, estos autores evaluaron la actividad proteolítica de la Alicina mediante zimografía en gel, se redujo la actividad enzimática a manera dependiente de las dosis de todas las proteasas de *P. gingivalis* y la actividad de las gingipainas Arg fue inhibida en el 97% a concentraciones de 60 µg/ml.

Khodavandi y cols.⁷⁰ compararon la eficacia antifúngica *in vitro* de la Alicina y el Fluconazol en cepas de *C. albicans* (ATCC 14053) y 9 muestras aisladas de pacientes con candidiasis sistémica. Utilizaron Alicina a diluciones de 0.05 a 25 µg

mL⁻¹ y Fluconazol de 0.03 a 64 µg mL⁻¹. Colocaron 100 µL del inóculo conteniendo entre 5×10^2 y 2.5×10^3 de levaduras en una micro placa e incubados a 35°C para posteriormente determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Utilizaron inóculos de *C. albicans* ATCC 14053 (1×10^4 mL⁻¹ y 1×10^6 mL⁻¹) los cuales crecieron en presencia de 0.01 µg mL⁻¹ de Alicina y 2 µg mL⁻¹ de Fluconazol, basado en las concentraciones mínimas inhibitorias y un grupo control sin tratar. Después de 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h de incubación a 35°C, tomaron 100 µL de esta solución y la incubaron 24 h a 37°C contaron el número de colonias y calcularon las CFU. La Alicina y Fluconazol inhibieron el crecimiento de *C. albicans* en los diferentes tamaños del inóculo, la cual fue significativa después de 4 h de incubación ($P < 0.01$) en comparación con el grupo control para ambos tamaños del inóculo. Por medio de microscopia electrónica determinaron que a diferentes concentraciones de Alicina y Fluconazol se presentaron cambios morfológicos en la superficie celular, observaron que se tornaba áspera e irregular, a mayores concentraciones (10 x MIC) de los medicamentos, la Alicina perforó la superficie celular y Fluconazol indujo la lisis celular.

Borhan-Mojabi y cols.⁷¹ compararon la eficacia antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentraciones de extracto de ajo en la reducción de las bacterias salivales. Recolectaron muestras de saliva de 40 pacientes, cada muestra la dividieron en 3 grupos, mezclaron 1 ml de saliva con 9 ml de suero fisiológico estéril, posteriormente con esta mezcla realizaron diluciones seriadas para preparar suspensiones a concentraciones de 1×10^{-3} . Colocaron 1ml de extracto de ajo hidro-alcohólico a 1 ml de la muestra salival que fue transferido a un medio de cultivo agar tripticasa. Las muestras las expusieron a concentraciones de 40 y 70 mg/ml de extracto de ajo durante 30 y 60 segundos, después incubaron las placas a 37°C por 48h. Dentro de sus resultados obtuvieron que las concentraciones del 40% a 30 segundos tuvieron una reducción del 78% de CFU (1235.7 ± 765.06) y a 60 segundos del 83.5% de CFU (941.52 ± 651.15). La concentración del 70% a 30 segundos redujo 86.5% de CFU (771.72 ± 703.86) y a 60 segundos 90.8% de CFU (524.8 ± 497.4).

Velliyagounder y cols.⁷² evaluaron el efecto antimicrobiano del Dialil-Sulfuro (DAS) y Alicina sobre *A. actinomycetemcomitans*. Probaron concentraciones de Alicina y DAS de 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/ml. La Alicina a concentraciones de 10, 1, 0.1 µg/ml eliminó en su totalidad a la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, sin embargo, a la concentración de 0.01 µg/ml solamente redujo la carga bacteriana a 1×10^5 CFU/ml ($P < 0.01$). Por su parte, DAS presentó actividad antimicrobiana significativa a las diferentes concentraciones, a 10 µg/ml eliminó por completo la bacteria, incluso a la concentración de 0.01 µg/ml disminuyó los niveles bacterianos ($P < 0.01$). Estos autores evaluaron la viabilidad bacteriana del biofilm mediante microscopia confocal, el biofilm fue expuesto a 0.01 µg/ml de DAS durante 2 h, el cual disminuyó significativamente el crecimiento bacteriano a 1×10^2 CFU/ml en relación al grupo control PBS ($P < 0.01$). Además, evaluaron la citotoxicidad de DAS sobre células epiteliales (OBA9) expuestas durante 12 h a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 µg/ml de DAS. Reportando una gran biocompatibilidad ya que no encontraron inhibición del crecimiento celular a la concentración de 0.01 µg/ml. Mediante citometría de flujo encontraron que ninguna de las concentraciones de DAS indujo apoptosis en las células OBA9 a 12 h de exposición.

Zaragoza y cols.⁷³ realizaron una prueba *in vitro* para evaluar la efectividad antimicrobiana de ODDM en cepas bacterianas de *S. aureus*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*, *E. coli* y *Pseudomona sp* mediante una prueba de difusión agar con discos de papel filtro impregnados con 5 µl de ODDM, incubados a 37°C por 24 horas, posteriormente midieron los halos de inhibición obteniendo un promedio de 12 mm para ODDM de manera que inhibió el crecimiento de todas las cepas bacterianas evaluadas.

Bokaeian y Bameri⁵ analizaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso del ajo en enterococos aislados de 120 muestras de pacientes (47 muestras de orina, 34 de sangre, 21 de piel y tejidos blandos y 18 de sistema respiratorio) de las cuales el 79.2% fueron *E. faecalis* y el 20.8% *Enterococcus faecium*. Realizaron pruebas de sensibilidad mediante el método de difusión en discos, utilizaron el extracto de ajo a una concentración de 512 mg/ml, después de 24 h de incubación

midieron los halos de inhibición y determinaron la concentración mínima inhibitoria. Además, realizaron ensayos de sensibilidad antimicrobiana con diversos antibióticos: colocando sensidiscos con 15 µg de Eritromicina, 30 µg de Tetraciclina, 10 µg de Ampicilina, 10 µg de Gentamicina, 5 µg de Ciprofloxacino, 30 µg de Vancomicina y 15 µg de Cloranfenicol. Siguieron las guías CLSI, sus resultados demostraron que la mayor resistencia antimicrobiana fue a Eritromicina (95.8%), Tetraciclina (88.3%), y Ampicilina (65.8%), la menor resistencia a Cloranfenicol (6.8%), Vancomicina (20%) y Ciprofloxacino (25%). El extracto de ajo fue efectivo en todas las muestras bacterianas de enterococos, presentó zonas de inhibición de 16.8 ± 1.8 mm y MIC de 4-32 mg/ml.

Lihua y cols.⁷⁴ investigaron los efectos de la Alicina en la formación de biofilm de *P. aeruginosa*, incluyendo la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la inducción de la expresión de factores de virulencia mediante quórum sensing (QS). Utilizaron concentraciones de Alicina de 10 µg/ml y 128 µg/ml y a través de microscopía láser confocal determinaron el radio de adhesión bacteriana en un periodo de tiempo de 1, 3, 5, 6 y 9 h, donde observaron que a las 6 h y a la concentración de 128 µg/ml el radio de adhesión disminuyó de 0.70 ± 0.03 a 0.50 ± 0.01 ($p < 0.05$), sin embargo, después de 9 h el efecto en la adhesión se perdió. Además, estos autores reportan que Alicina reduce la producción de EPS en relación a un grupo control (602.66 ± 21.94 µg), alicina 10 µg/ml (217.10 ± 8.68 µg) y 128 µg/ml (181.19 ± 1.59 µg). Los factores de virulencia fueron tratados con 128 µg/ml de Alicina y reportaron que la expresión de Endotoxina A fue de (6.529 ± 0.289), Elastasa (0.032 ± 0.001), Pioverdina (7819.167 ± 111.800) y Ramnolípidos (0.269 ± 0.009) siendo estos valores menores en relación al grupo control: Endotoxina A (19.6 ± 0.5), Elastasa (0.46 ± 0.003), Pioverdina (9325.8 ± 367.675) y Ramnolípidos (2.0 ± 0.063).

Ponnuswamy y Jeyalakshmi⁷⁵ realizaron un estudio *in vitro* comparativo para evaluar el efecto antimicrobiano de la Alicina y Vancomicina en 13 muestras de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) aisladas clínicamente. Realizaron una prueba de sensibilidad mediante el método de difusión agar Kirby Bauer, en el cual

Vancomicina presentó halos de inhibición de 18 mm de diámetro para todas las muestras y Alicina al 1% en las muestras 4, 10 y 11 presentó 27 mm, 14 mm y 15 mm ($P < 0.001$) respectivamente, en el resto de las muestras los valores fueron < 10 mm. Por lo tanto, Alicina al 1% fue efectiva en eliminar MRSA en el 23.08% de las muestras.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La presencia de microorganismos y sus productos dentro del sistema de conductos provoca una respuesta del huésped, la cual puede reflejarse clínica y radiográficamente como alteraciones periapicales⁴⁷, el resultado del tratamiento endodóntico depende de la reducción o eliminación de la carga bacteriana. En el 60-90% de los casos con periodontitis apical, los tubulillos dentinarios son invadidos por bacterias^{1,20} y su total eliminación es difícil de conseguir debido a la complejidad que presenta el sistema de conductos ya que este se conforma de varias ramificaciones que se desprenden de los diferentes tercios del conducto principal como son: conductos colaterales, conductos laterales, conductos secundarios, conductos accesorios, interconductos, conductos recurrentes, cavo radicular, conductos reticulares, deltas apicales y conductos en C, todas representan un sitio donde queda retenido tejido pulpar que provee condiciones adecuadas para el alojamiento y proliferación bacteriana^{4,20,76}.

Sakko y cols.⁴ mencionan que además de bacterias también se pueden encontrar hongos y virus en la periodontitis apical, en donde hasta el momento han sido aisladas más de 500 especies en infecciones endodónticas^{4,21}.

Vincent²¹ menciona que las especies bacterianas más frecuentemente aisladas son: *Dialister spp* (44-55%), *Filifactor alocis* (46%), *Parvimonas micra* (5-28%), *Pseudoramibacter alactolyticus* (32-56%), *E. faecalis* (77%), *Eubacterium spp* (73%), *Streptococcus spp* (21-41%), *V. párvula*, *Lactobacillus spp*, *Selenomonas spp*, *Peptostreptococcus spp* (35-45%), *O. uli* (10.5-74%), *Actinomyces spp*, *P. acnes*, *P. porpionicum* (36%), *T. denticola* (15-68%), *T. socranskii* (35%), *Treponema maltophilum*, *Treponema parvum*, *F. nucleatum* (11.7-44%), *E. corrodens* (23-63%), *Campylobacter spp* (80-90%), *T. forsythia* (19-51%), *P. endodontalis* (5-61%), *P. gingivalis* (6.7-30%), *Prevotella spp* (16.5-50%).

Persoon y cols.⁷⁷ reportan que la prevalencia general de hongos en los conductos radiculares es de un 7.5% y la especie más frecuentemente aislada es *C. albicans*.

Varios estudios han demostrado que la preparación mecánica y la irrigación eliminan únicamente del 50-70% de microorganismos¹ por lo que es importante la colocación de una medicación intraconducto entre citas la cual tiene como objetivo eliminar los microorganismos que la preparación biomecánica omite⁷⁸.

Actualmente el Ca(OH)_2 es considerado la medicación intraconducto más efectiva y la que más se utiliza en endodoncia, sin embargo, presenta ciertas desventajas en su uso a corto plazo para desinfectar los tubulillos dentinarios debido a varios factores^{33,78}:

- La capacidad de la dentina de amortiguar ciertas sustancias entre ellas el Ca(OH)_2 .
- Su baja solubilidad y difusión hacen que sea difícil que alcance un rápido aumento en el pH para lograr el nivel necesario para eliminar las bacterias dentro de los tubulillos y variaciones anatómicas.
- Variaciones en la alcalinidad de las diferentes formulaciones de Ca(OH)_2 .
- El biofilm presente en los tubulillos dentinarios actúa como una barrera protectora para las bacterias que lo conforman, de tal manera que el Ca(OH)_2 no llega a tener ningún efecto sobre ellas^{1,2}.
- El tejido necrótico remanente en ramificaciones o istmos puede proteger a las bacterias de la acción del Ca(OH)_2 ¹.

Otro inconveniente que presenta el uso del Ca(OH)_2 es la cantidad de vehículos con los que se puede mezclar ya que este va a determinar la velocidad de disociación iónica y de esto va a depender la disponibilidad de iones hidroxilo (OH^-) en solución y a su vez que presente efecto antimicrobiano, mientras más baja sea la viscosidad de la pasta mayor será la disociación iónica¹.

Sin embargo, Pacios y *col.s.*,³⁶ recomiendan utilizar el Ca(OH)_2 mezclado con paramonoclorofenol alcanforado, o propilenglicol con paramonoclorofenol alcanforado para mejorar su efectividad antimicrobiana.

Otra desventaja que presenta es su difícil remoción de las paredes dentinarias, ya que quedan remanentes de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ que impiden la penetración de los cementos selladores a los tubulillos dentinarios, lo cual lleva a que existan microfiltraciones y se vea comprometido el tratamiento endodóntico⁷⁹⁻⁸¹.

Las múltiples investigaciones realizadas en relación al $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no han podido esclarecer su efecto antimicrobiano, por su parte Chen y cols.⁸² demostraron que la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no es capaz de inhibir el crecimiento de biofilm extrarradicular de *E. faecalis*. En estudios *in vitro* en órganos dentales inoculados con *E. faecalis* se ha demostrado que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con solución salina y polietilenglicol como vehículos son inefectivos para eliminar esta bacteria de los tubulillos dentinarios^{83,84}. Estudios *in vivo* demuestran que $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es insuficiente para eliminar la microbiota que persiste después de la instrumentación químico mecánica^{85,86}.

Por otra parte, se han reportado accidentes provocados por la colocación de esta pasta durante el tratamiento endodóntico como el de Lindgren y cols.⁸⁷ quienes reportaron un caso de isquemia facial severa después de haber colocado pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con jeringa como medicación intraconducto, la cual se introdujo en la arteria alveolar inferior, como consecuencia de una perforación apical en el conducto distal. Del mismo modo Bruyne y cols.⁸⁸ reportaron un caso de necrosis gingival causada por la extrusión de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a través de la raíz, esto remarca la necesidad de encontrar materiales más biocompatibles para ser utilizados como medicación intraconducto, además deja claro que durante el tratamiento endodóntico se pueden llegar a cometer errores clínicos que comprometan la salud general de los pacientes.

El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no puede ser considerado como medicación intraconducto universal para todos los casos de conductos infectados y periodontitis apical¹ no es una panacea, tiene un efecto antibacterial limitado que no afecta a todos los microorganismos que forman parte de la microbiota endodóntica, además sus propiedades fisicoquímicas pueden limitar su efectividad en la desinfección completa del sistema de conductos después de un periodo de tiempo corto² por lo

que sería importante evaluar nuevos principios activos en distintas formas farmacéuticas con efectos antimicrobianos de amplio espectro y más biocompatibles, que permitan cumplir de una manera más eficiente la desinfección del sistema de conductos.

4.1. Pregunta de Investigación.

¿Qué efecto antimicrobiano *in vitro* presentará el hidrogel a base de ODD-M en relación a las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$?

5. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que la preparación químico mecánica de los conductos es insuficiente para erradicar en su totalidad la diversidad de bacterias presentes en el sistema de conductos, el uso de una medicación intraconducto es esencial para ayudar a controlar la infección y eliminar los remanentes bacterianos¹⁹. Athanassiadis y cols.¹ mencionan que se han empleado diferentes medicamentos para tratar de lograr estos objetivos, sin embargo, esto no se ha logrado, además señalan que el Ca(OH)_2 podría no ser el medicamento ideal para todos los casos, lo cual remarca la necesidad de emplear nuevos agentes antimicrobianos con amplio espectro que sean seguros y efectivos como medicación intraconducto⁴.

En la actualidad existe en el mercado un producto antimicrobiano de amplio espectro que tiene como principio activo el óxido dialil disulfuro modificado (ODD-M). Autores como Gómez y cols.⁸⁹ determinaron que el ODD-M tiene efecto antimicrobiano significativo en biofilm procedente de aparatología ortodóntica, con una concentración terapéutica que no ha reportado efectos tóxicos. Por otra parte, Zaragoza y cols.⁷³ realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* con ODD-M para evaluar la efectividad en cepas bacterianas de *S. aureus*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*, *E. coli* y *Pseudomona sp*, reportando que ODD-M inhibió el crecimiento de todas las cepas bacterianas evaluadas. Además, investigadores como Bakri y Douglas⁸ presentaron evidencia *in vitro* del efecto antimicrobiano de la Alicina, demostrando que es efectiva contra especies bacterianas orales, particularmente Gram negativas, por otra parte, Bachrach y cols.⁶⁹ sugieren que la Alicina puede ser utilizada como un principio activo antimicrobiano candidato para pruebas *in vivo* como agente para la prevención y tratamiento de enfermedades dentales.

Los hidrogeles se han aplicado en diferentes áreas como: medicina, biotecnología, farmacia e industria. Se han empleado como sistemas de suministro de medicamentos, apósitos húmedos, matrices para el cultivo de células, lentes de contacto, sensores, como reemplazo de tendones, piel, ligamentos y cartílago, entre

muchas otras aplicaciones. Son materiales biocompatibles e inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su superficie^{65,66}.

Cabe destacar que el ODD-M es un producto farmacéutico que está a la venta en presentación de hidrogel el cual tiene una concentración de 80 µg/ml.

Rangel y cols.⁹⁰ evaluaron *in vitro* el grado de remoción y permeabilidad de los tubulillos dentinarios de un hidrogel de superoxidación comparado con el Ca(OH)₂, reportan que, al eliminar el hidrogel del conducto, los tubulillos dentinarios permanecen con mayor permeabilidad y menor cantidad de remanentes en relación al Ca(OH)₂ cómo se observa en la figura 6.

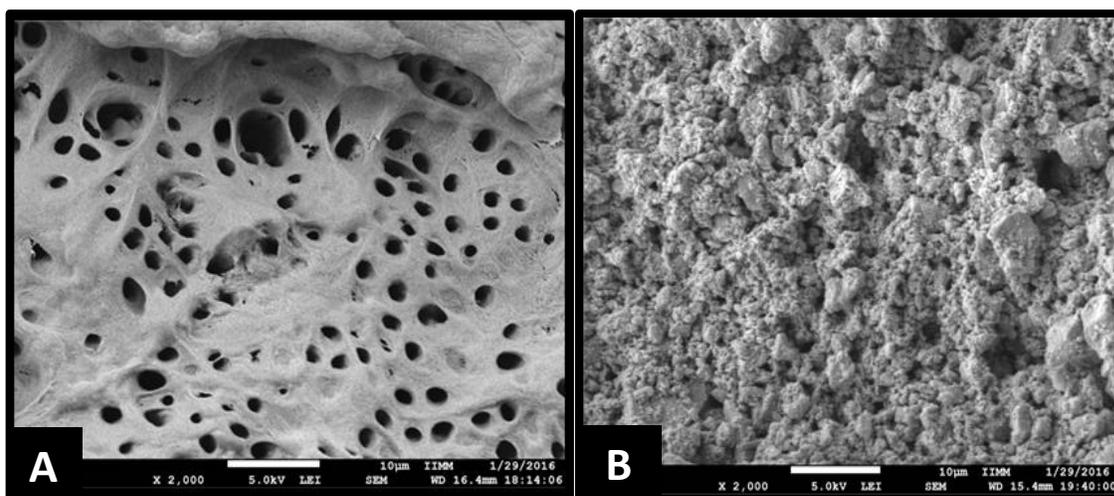


Figura 6. A. Microfotografía a 2000X del tercio apical donde se observan túbulos dentinarios permeables después de retirar el hidrogel a base de superoxidación. B. Microfotografía a 2000X del tercio apical donde se observan capas gruesas de remanentes de Ca(OH)₂ sobre la pared dentinaria del conducto radicular (Rangel y cols. 2018).

Por lo cual es importante evaluar el efecto antimicrobiano de este producto farmacéutico en presentación de hidrogel a base de ODD-M sobre especies bacterianas encontradas en infecciones de origen endodóntico, ya que no existen reportes en la literatura sobre esto. Por lo tanto, realizar ensayos de sensibilidad antimicrobiana con este producto, marcará la pauta para realizar más estudios experimentales *in vitro* y clínicos, que permitan sustentar a futuro su uso como medicación intraconducto, además de desarrollar estrategias clínicas para su uso y

aplicación, de manera que se pueda cumplir más adecuadamente con los principios de limpieza y desinfección.

6. HIPÓTESIS.

6.1. Hipótesis de trabajo.

El hidrogel a base de ODD-M presentará mayor efecto antimicrobiano *in vitro* en relación a las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

6.2. Hipótesis nula.

El hidrogel a base de ODD-M presentará un efecto antimicrobiano *in vitro* similar a las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

7. OBJETIVOS.

7.1. Objetivo General.

Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* de 2 pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en relación a un hidrogel a base de Óxido Dialil Disulfuro Modificado.

7.2. Objetivos Específicos:

1. Estandarizar el modelo experimental *in vitro* para la colocación de pastas e hidrogeles en medios de cultivo bacterianos sólidos.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano de las pastas e hidrogeles en cepas ATCC de *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mitis* y *C. albicans*, mediante ensayos de sensibilidad.

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

8.1. Tipo de estudio.

- Investigación experimental, comparativo, cuantitativo

8.2. Variables.

- Medición de los halos de inhibición
- Cepas bacterianas ATCC

8.3. Reactivos. (Figura 7).

- ULTRACAL™ XS™ (ULTRADENT) Hidróxido de Calcio 35%.
- Microdacyn® 60 Hydrogel de Superoxidación (Oculus).
- Dalacin T® (Pfizer) Clindamicina 1% (Lote: S42450, Caducidad: ENE/19).
- Accua Aséptic Gel® (CELL PHARMA) Óxido Dialil Disulfuro Modificado (ODD-M) (Lote: C0190217, Caducidad MAY/19).
- Bexident® Encías (ISDIN) Gel de Clorhexidina al 0.2% (Lote: 629411 Caducidad: 10/19).
- Hidróxido de Calcio (VIARDEN) (Lote: 040217, Caducidad: 03/02/20).
- Agua inyectable (PISA).



Figura 7. Reactivos en presentaciones comerciales

8.4. Estandarización del depósito de los hidrogeles

8.4.1. Colocación de reactivos en dispositivos dispensadores.

Se utilizaron 5 jeringas estériles de 3 ml TERUMO®, a las cuales se les retiró el émbolo con cuidado para no dañarlo y se vertió el hidrogel correspondiente directamente de su presentación comercial en el cuerpo milimetrado de la jeringa de tal manera que no quedaran burbujas de aire y calculando que se depositaran entre 2 y 2.5 ml de hidrogel en cada una (Figura 8).

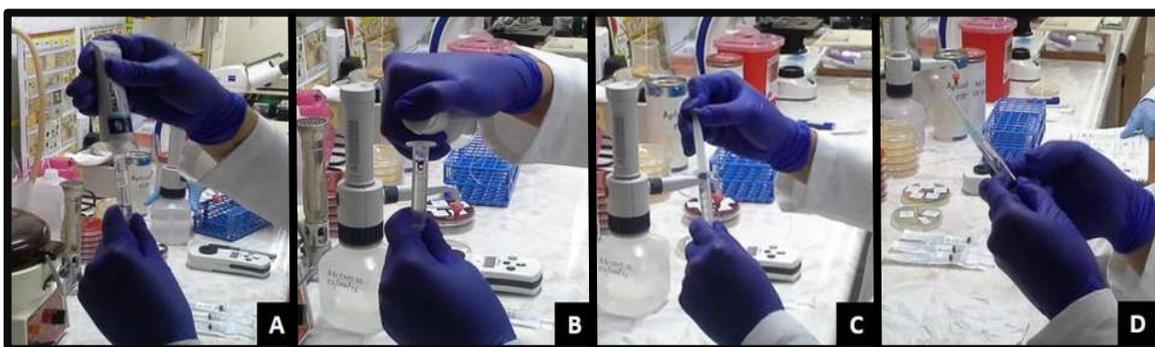


Figura 8. Colocación de reactivos en dispositivos dispensadores. A. Colocación de Dalacin T® en la jeringa 3. B. Llenado de la jeringa 2 con Microdacyn® 60. C. Reincorporación del émbolo al cuerpo de la jeringa. D. Eliminación de burbujas.

8.5. Preparación de las Pastas.

a) UltraCal™ XS™ ULTRADENT.

La pasta de Ca(OH)_2 UltraCal™ XS™ se utilizó directamente de la jeringa en la que viene el producto (Figura 9).



Figura 9. UltraCal™ XS™

b) Hidróxido de Calcio VIARDEN

Se utilizó el polvo de Ca(OH)_2 de la marca Viarden del lote 040217 con fecha de caducidad del 03/02/20 (Figura 10).



Figura 10. Ca(OH)_2 VIARDEN

8.5.1. Preparación de Medicación Convencional de Ca(OH)_2 .

El Ca(OH)_2 se preparó bajo las condiciones en las que se realiza en la práctica endodóntica diaria, se colocó n cantidad de polvo en una loseta estéril y se determinó colocar 2 ml de agua destilada para tratar de estandarizar el procedimiento y que la cantidad de Ca(OH)_2 fuera la misma que el resto de los hidrogeles. Con una espátula estéril se mezclaron el líquido y el polvo hasta conseguir la consistencia adecuada para posteriormente aspirar la mezcla con la boquilla de la jeringa (Figura 11) y después depositarlo en las cavidades asignadas a este compuesto. Cabe mencionar que esta pasta se preparó hasta el momento de su colocación en los medios de cultivo para evitar que se deshidratara la mezcla.

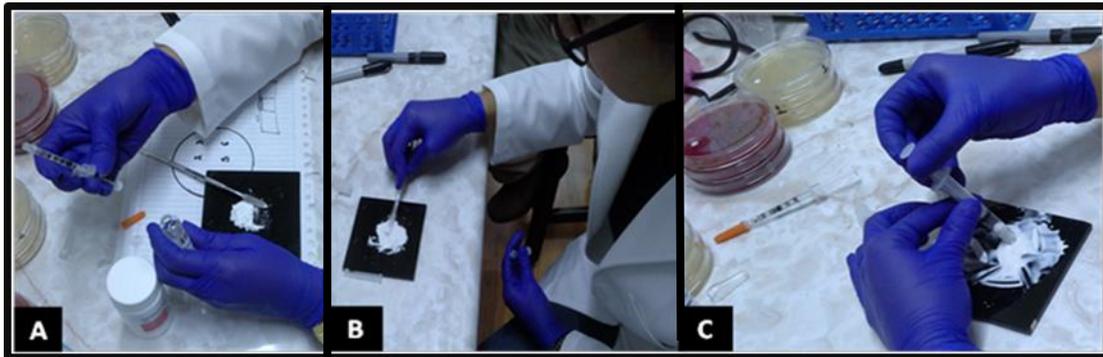


Figura 11. Preparación de la pasta de Ca(OH)_2 . A. y B. Mezcla del polvo de Ca(OH)_2 con 2 ml de agua destilada C. Llenado de la jeringa con la pasta de Ca(OH)_2 .

8.6. Clasificación de Grupos de Estudio.

A cada jeringa con su respectivo reactivo se le asignó un número de la siguiente manera (Figura 12):

1. ULTRADENT™ XS™
2. Microdacyn® 60 Hydrogel
3. Dalacin T®
4. Accua Aséptic Gel®
5. Bexident® Encías
6. Hidróxido de Calcio en polvo mezclado con agua destilada.



Figura 12. Jeringas con los reactivos.

8.7. Preparación del Medio de Cultivo.

Se utilizó agar Mueller-Hinton deshidratado BD Bioxon del cual se disolvieron 38 gr en 1 lt de agua destilada, se hidrato durante 10 a 15 minutos, se mezcló bien agitando frecuentemente, se dejó hervir durante 1 minuto y se esterilizo a 121°C por un tiempo no mayor a 15 minutos. Se dejó enfriar a 40 – 45°C, posteriormente se vació en cajas de Petri hasta obtener un grosor aproximado de 4 mm.

Para preparar el medio Mueller-Hinton con sangre, se realizó el mismo procedimiento previamente descrito, una vez que estuvo a una temperatura de 40-45°C se adicionaron 50 ml de sangre de carnero posteriormente se vació en cajas de Petri hasta obtener un grosor aproximado de 4 mm.

8.8. Cepas.

Se utilizaron las siguientes cepas (Figura 13):

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Streptococcus mitis*
- *Candida albicans*



Figura 13. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

8.9. Preparación del Inóculo Bacteriano.

Se depositaron 3 ml de solución salina en 4 tubos de ensayo, en los cuales se ajustaron los inóculos a la escala de McFarland 0.5 y 1.8 correspondiente para cada cepa bacteriana y se les asignó un número como se muestra en la tabla 3:

Tabla 3: Clasificación y preparación de los inóculos bacterianos.

TUBO	MICROORGANISMO	ESCALA DE McFARLAND (0.5)	RANGO	VALORES OBTENIDOS
1	<i>S. aureus</i>	$1.5 \cdot 10^8$ UFC	0.5 - 0.63 McF	0.51
2	<i>E. faecalis</i>	$1.5 \cdot 10^8$ UFC	0.5 - 0.63 McF	0.54
3	<i>C. albicans</i>	$6.0 \cdot 10^8$ UFC	1.80 - 2.20 McF	1.85
4	<i>S. mitis</i>	$1.5 \cdot 10^8$ UFC	0.5 - 0.63 McF	0.76

Posteriormente se encendió un mechero bunsen y con un aplicador de madera estéril se tomaron colonias de una cepa bacteriana y se disolvieron en los 3 ml de solución salina de un tubo, hasta homogenizar la mezcla, este procedimiento se repitió con las demás cepas bacterianas, la densidad de los inóculos se verificó con un DensiCHECK plus, como se muestra en la figura 14.

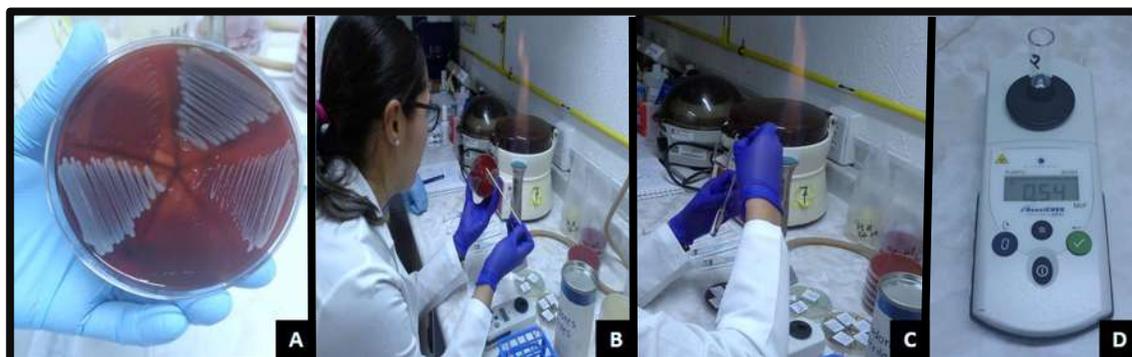


Figura 14. Preparación del inóculo bacteriano. A. Cepas bacterianas. B. Toma de las colonias bacterianas. C. Disolución de las colonias bacterianas. D. Ajuste del inoculo en la escala de McFarland con DensiCHECK plus.

8.10. Inoculación de las Placas.

Se utilizaron 12 cajas de Petri, formando 4 grupos de 3 cajas cada uno, los cuales fueron enumerados del 1 al 4 como se muestra en la figura 15, de manera que los medios de cultivo y las suspensiones bacterianas previamente enumeradas correspondieran de la siguiente manera como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Relación del medio de cultivo con la suspensión

Medio de cultivo (cajas de Petri)	Suspensión bacteriana (tubos de ensayo)
1. Agar Mueller-Hinton	1. <i>S. aureus</i>
2. Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero	2. <i>E. faecalis</i>
3. Agar Mueller-Hinton	3. <i>C. albicans</i>
4. Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero	4. <i>S. mitis</i>



Figura 15. Medios de cultivo.

Posteriormente se procedió a realizar una siembra masiva utilizando hisopos estériles embebidos con la suspensión bacteriana ajustada correspondiente, el hisopo se presionó sobre la pared interna del tubo, por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso, después se frotó la superficie del medio de cultivo estéril con el hisopo, dando giros a la placa para asegurar una correcta distribución del inóculo (Figura 16).

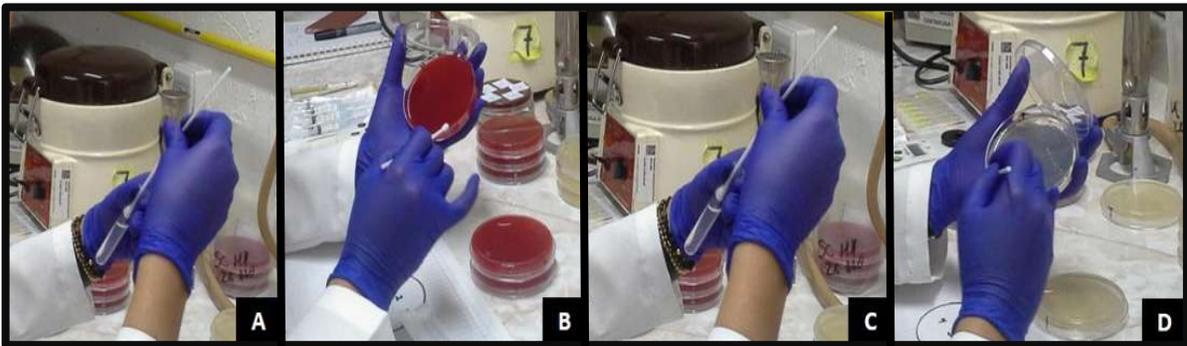


Figura 16. Inoculación de las placas. A. y C. Hisopos embebidos con suspensión bacteriana, B. y D. Siembra masiva.

8.11. Acondicionamiento de Cavidades en Medios de Cultivo.

Previamente se diseñó una plantilla y cada medio de cultivo se colocó sobre ella para realizar sobre esa guía los pozos en el agar y distribuir equitativamente las 6 cavidades que se realizaron con el diámetro más grande de una micro pipeta Pasteur en cada uno de los medios de cultivo (figura 17), finalmente se marcó cada cavidad con los números del 1 al 6.

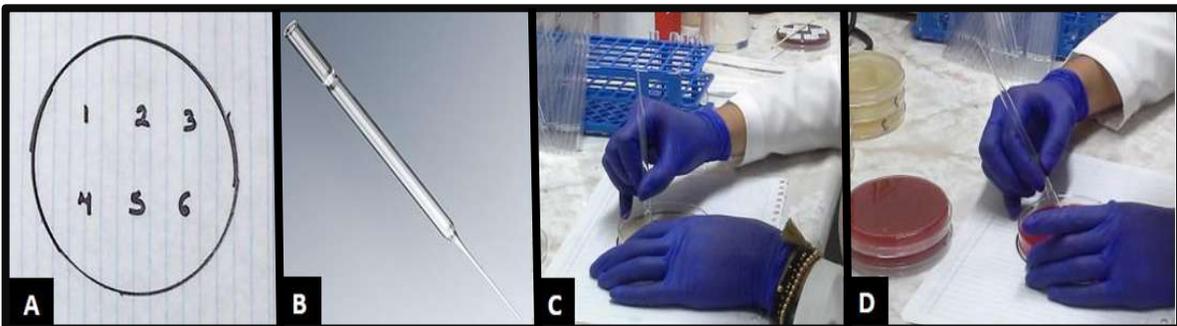


Figura 17. Acondicionamiento de cavidades en medios de cultivo. A. Plantilla para distribución de cavidades, B. Micro pipeta Pasteur, C y D. Confección de cavidades en medios de cultivo.

8.12. Colocación de Hidrogeles y Pastas en Cavidades.

Una vez que se realizaron las cavidades correspondientes en cada uno de los medios de cultivo se distribuyeron los hidrogeles y las pastas de la siguiente manera (Figura 18):

1. Hidróxido de calcio ULTRADENT™ XS™
2. Microdacyn® 60 Hydrogel
3. Dalacin T®
4. Accua Aséptic Gel®
5. Bexident® Encías
6. Hidróxido de calcio mezclado con agua destilada.

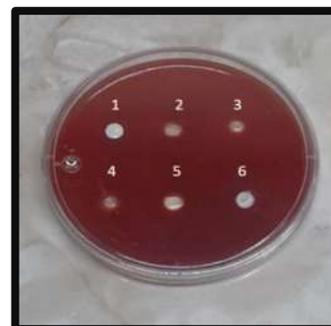


Figura 18. Distribución de hidrogeles y pastas en medios de cultivo.

Se utilizaron agujas desechables estériles TERUMO® de 20 G x 32 mm para colocar las pastas y los hidrogeles en las perforaciones de los medios de cultivo, se cambió de aguja para cada una de las cepas bacterianas, para cada hidrogel y para cada pasta (Figura 19).

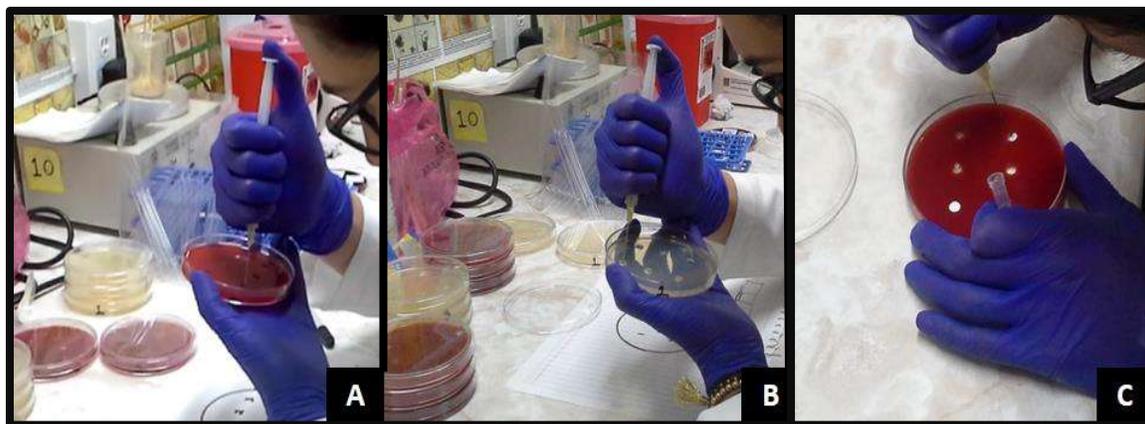


Figura 19. A y B. Colocación de hidrogel C. Colocación de pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

8.13. Incubación de Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo enriquecidos con sangre y que fueron inoculados con *E. faecalis* y *S. mitis* se depositaron dentro de un frasco de vidrio con velas encendidas y se tapó, con la finalidad de generar CO_2 , para mejorar las condiciones de anaerobiosis. Después el frasco con los medios de cultivo y los medios de cultivo

“COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE UN HIDROGEL DE ÓXIDO DIALIL DISULFURO MODIFICADO EN RELACIÓN AL HIDRÓXIDO DE CALCIO”

inoculados con *S. aureus* y *C. albicans* se llevaron a una estufa de cultivo a una temperatura de 37°C por 24 h (Figura 20).



Figura 20. Incubación de medios de cultivo. A. Contenedor con los medios de cultivo enriquecidos con sangre. B. Estufa de cultivo. C. Medios de cultivo dentro de la estufa.

8.14. Medición de Halos de Inhibición.

Después de 24 h se midió el diámetro de los halos de inhibición inducidos por cada uno de los hidrogeles y pastas, mediante un vernier como se muestra en la figura 21. Se registraron los datos en una bitácora.

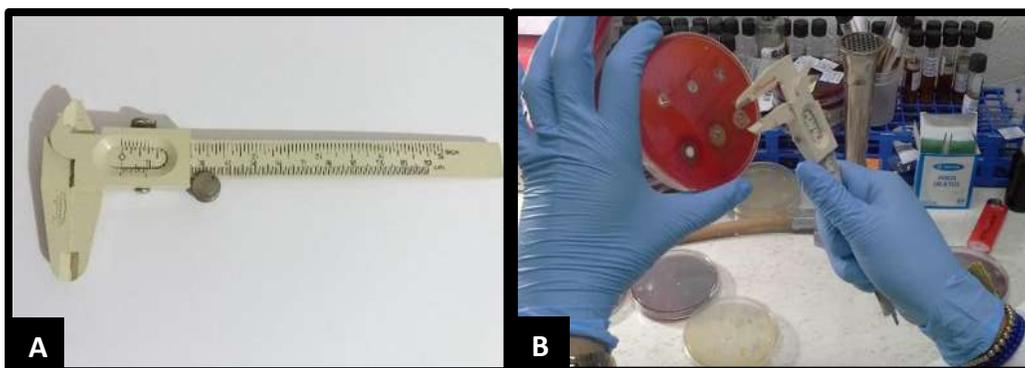


Figura 21. A. Vernier. B. Medición de halos de inhibición.

9. RESULTADOS.

9.1. Ensayos de Sensibilidad Antimicrobiana.

9.1.1. Halos de inhibición formados en la cepa de *S. aureus* (Figura 22 y 23).

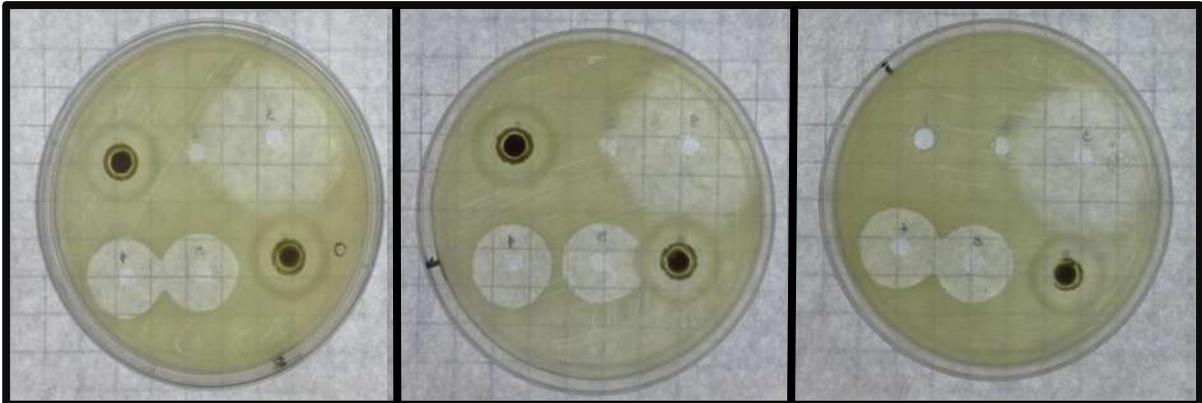


Figura 22. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *S. aureus* vistos sobre un negatoscopio.

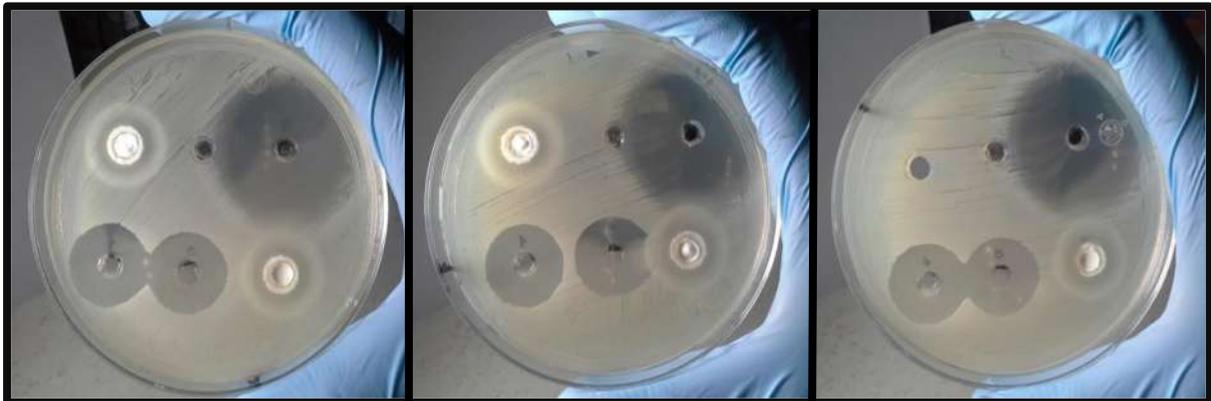


Figura 23. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *S. aureus* vistos a contraluz.

9.1.2. Halos de inhibición formados en la cepa de *E. faecalis* (Figura 24 y 25).

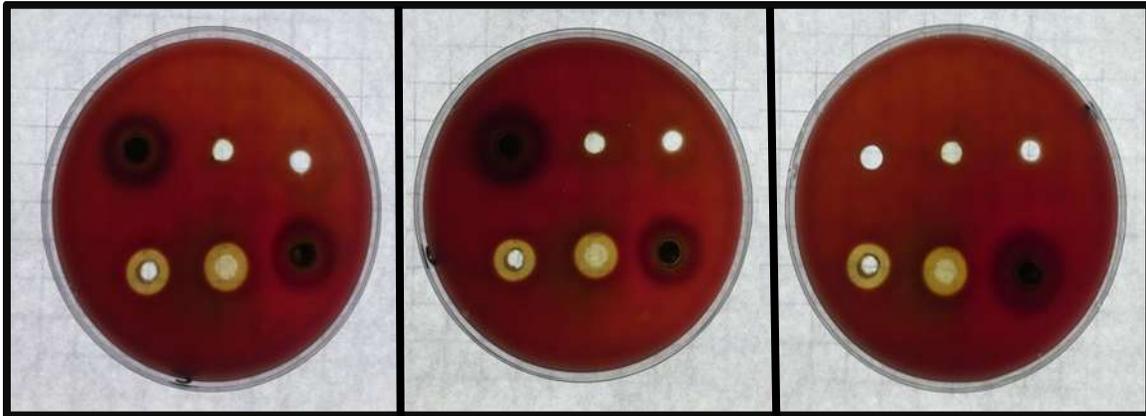


Figura 24. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *E. faecalis* vistos sobre un negatoscopio.



Figura 25. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *E. faecalis* visto a contraluz.

9.1.3. Halos de inhibición formados en la cepa de *C. albicans* (Figura 26 y 27).

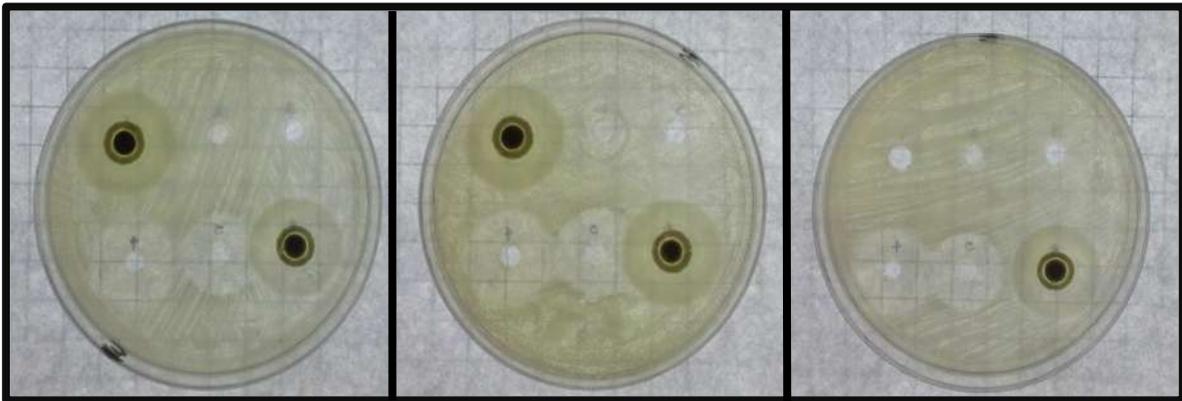


Figura 26. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *C. albicans* vistos sobre un negatoscopio.



Figura 27. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *C. albicans* visto a contraluz.

9.1.4. Halos de inhibición formados en la cepa de *S. mitis* (Figura 28 y 29).



Figura 28. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *S. mitis* vistos sobre un negatoscopio.



Figura 29. Halos de inhibición formados por los diferentes hidrogeles y pastas utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano en *S. mitis* visto a contraluz.

En la figura 30 se puede observar la difusión de la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sin embargo, se ve claramente que este no inhibió el crecimiento bacteriano.



Figura 30. Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Por esta razón se decidió observar al microscopio las cajas de Petri y de esta manera se confirmó la presencia de bacterias en donde se colocaron las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Figura 31).

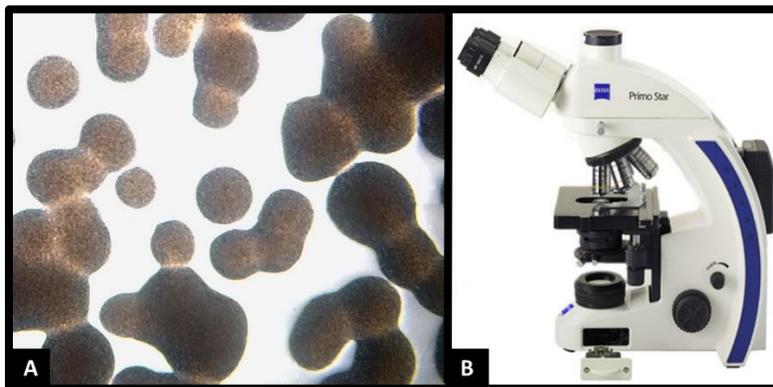


Figura 31. A. Fisión binaria de *S. aureus*, la cual se observó a través del microscopio después de la incubación, con la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. B. Microscopio.

9.2. Análisis Bioestadístico.

Se utilizó la prueba paramétrica T student con un nivel de confianza del 95% y $\alpha/2 = 0.05$ los datos se analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS versión 24.

9.2.1. Estadística Descriptiva.

Tabla 5: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por la pasta a base de Ca(OH)_2 ULTRACAL™ XS™ en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Tabla 6: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de superoxidación (Microdacyn® 60 hydrogel) en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Tabla 7: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de Clindamicina (Dalacin T®) en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
28.5 mm	Resistente	Resistente	41 mm
28 mm	Resistente	Resistente	39 mm
27 mm	Resistente	Resistente	38.5 mm
30 mm	Resistente	Resistente	39 mm
30 mm	Resistente	Resistente	38 mm
30 mm	Resistente	Resistente	39 mm
28.91 ± 1.28			39.08 ± 1.02

Tabla 8: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel ODD-M en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
19.5 mm	12 mm	19 mm	11.5 mm
19 mm	12 mm	19.5 mm	11 mm
20 mm	11.5 mm	20 mm	11 mm
20 mm	11.5 mm	21 mm	12 mm
20 mm	11 mm	21 mm	12 mm
21 mm	11 mm	20 mm	12 mm
19.91 ± 0.66	11.5 ± 1.28	20.08 ± 0.8	11.58 ± 0.49

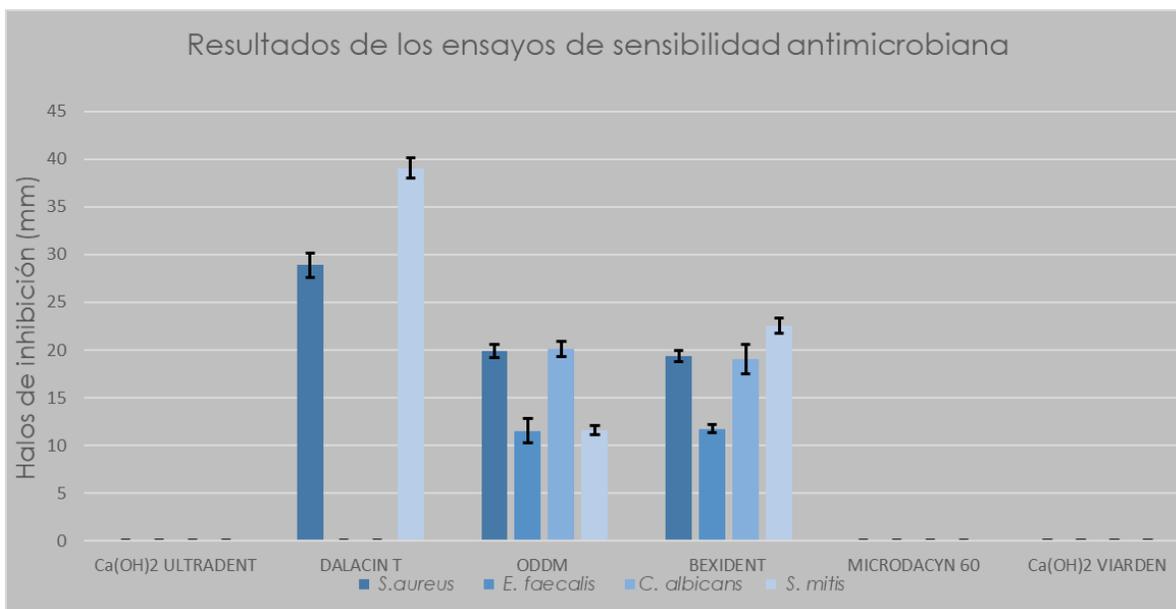
Tabla 9: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por el hidrogel de Clorhexidina (Bexident) en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
19 mm	11.5 mm	18 mm	23 mm
18.5 mm	12 mm	18 mm	21 mm
19 mm	11 mm	17 mm	22 mm
20 mm	12 mm	20 mm	22.5 mm
19.5 mm	12 mm	21 mm	22 mm
20 mm	12 mm	20 mm	23 mm
19.33 ± 0.6	11.75 ± 0.41	19 ± 1.54	22.5 ± 0.8

Tabla 10: Representa la sensibilidad antimicrobiana inducida por la pasta a base de Ca(OH)₂ VIARDEN en las cepas bacterianas.

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i>
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

9.2.2. Estadística Inferencial (Grafico de Error).



9.2.3. Tablas de Confrontaciones.

Tabla 11: Confrontaciones *S. aureus*.

CONFRONTACIONES	VALOR DE T CALCULADA	VALOR DE T CRITICA	DIFERENCIA ESTADISTICA
ODD-M vs BEXIDENT	1.58	1.81	NO
ODD-M vs MICRODACYN 60	73.4	1.81	SI
ODD-M vs DALACIN T	-15.27	1.81	SI
ODD-M vs ULTRACAL	58.72	1.85	SI
ODD-M vs VIARDEN	73.4	1.81	SI
BEXIDENT vs MICRODACYN 60	78.2	1.81	SI
BEXIDENT vs DALACIN T	-16.56	1.81	SI
BEXIDENT vs ULTRACAL	62.56	1.85	SI
BEXIDENT vs VIARDEN	78.2	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs DALACIN T	-55.28	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs ULTRACAL	0	1.85	NO
MICRODACYN 60 vs VIARDEN	0	1.81	NO
DALACIN T vs ULTRACAL	44.22	1.85	SI
DALACIN T vs VIARDEN	55.28	1.81	SI
ULTRACAL vs VIARDEN	0	1.85	NO

Tabla 12: Confrontaciones *E. faecalis*.

CONFRONTACIONES	VALOR DE T CALCULADA	VALOR DE T CRITICA	DIFERENCIA ESTADISTICA
ODD-M vs BEXIDENT	-0.93	1.81	NO
ODD-M vs MICRODACYN 60	42.45	1.81	SI
ODD-M vs DALACYN T	42.45	1.81	SI
ODD-M vs ULTRACAL	33.96	1.85	SI
ODD-M vs VIARDEN	42.45	1.81	SI
BEXIDENT vs MICRODACYN 60	68.8	1.81	SI
BEXIDENT vs DALACYN T	68.8	1.81	SI
BEXIDENT vs ULTRACAL	55.04	1.85	SI
BEXIDENT vs VIARDEN	68.8	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs DALACIN T	0	1.81	NO
MICRODACYN 60 vs ULTRACAL	0	1.85	NO
MICRODACYN 60 vs VIARDEN	0	1.81	NO
DALACIN T vs ULTRACAL	0	1.85	NO
DALACIN T vs VIARDEN	0	1.81	NO
ULTRACAL vs VIARDEN	0	1.85	NO

Tabla 13. Confrontaciones *C. albicans*.

CONFRONTACIONES	VALOR DE T CALCULADA	VALOR DE T CRITICA	DIFERENCIA ESTADISTICA
ODD-M vs BEXIDENT	1.52	1.81	NO
ODD-M vs MICRODACYN 60	61.41	1.81	SI
ODD-M vs DALACIN T	61.41	1.81	SI
ODD-M vs ULTRACAL	49.13	1.85	SI
ODD-M vs VIARDEN	61.41	1.81	SI
BEXIDENT vs MICRODACYN 60	30.04	1.81	SI
BEXIDENT vs DALACIN T	30.04	1.81	SI
BEXIDENT vs ULTRACAL	24.03	1.85	SI
BEXIDENT vs VIARDEN	30.04	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs DALACIN T	0	1.81	NO
MICRODACYN 60 vs ULTRACAL	0	1.85	NO
MICRODACYN 60 vs VIARDEN	0	1.81	NO
DALACIN T vs ULTRACAL	0	1.85	NO
DALACIN T vs VIARDEN	0	1.81	NO
ULTRACAL vs VIARDEN	0	1.85	NO

Tabla 14: Confrontaciones *S. mitis*.

CONFRONTACIONES	VALOR DE T CALCULADA	VALOR DE T CRITICA	DIFERENCIA ESTADISTICA
ODD-M vs BEXIDENT	-29	1.81	NO
ODD-M vs MICRODACYN 60	57.71	1.81	SI
ODD-M vs DALACIN T	-59.46	1.81	SI
ODD-M vs ULTRACAL	46.17	1.85	SI
ODD-M vs VIARDEN	57.71	1.81	SI
BEXIDENT vs MICRODACYN 60	32.69	1.81	SI
BEXIDENT vs DALACIN T	-49.67	1.81	SI
BEXIDENT vs ULTRACAL	26.15	1.85	SI
BEXIDENT vs VIARDEN	32.69	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs DALACIN T	-93.8	1.81	SI
MICRODACYN 60 vs ULTRACAL	0	1.85	NO
MICRODACYN 60 vs VIARDEN	0	1.81	NO
DALACIN T vs ULTRACAL	75.04	1.85	SI
DALACIN T vs VIARDEN	93.8	1.81	SI
ULTRACAL vs VIARDEN	0	1.85	NO

10. DISCUSIÓN.

Idealmente el tratamiento endodóntico debería eliminar todos los microorganismos presentes en todo el sistema de conductos, sin embargo, es ampliamente reconocido que aun con la gran variedad de instrumentos disponibles, sustancias y técnicas empleadas, conseguir esta meta es imposible. Durante varios años se ha empleado al Ca(OH)_2 para complementar el efecto antibacterial de la preparación químico mecánica del sistema de conductos y predeciblemente, hacer que los conductos radiculares estén libres de bacterias cultivables previo a la obturación⁹¹.

El uso del Ca(OH)_2 ha sido motivo de controversia ya que en la literatura se han reportado estudios contradictorios que indican, por una parte, que presenta efecto antimicrobiano mientras que otros señalan que carecen de él, por lo que podría no ser el medicamento ideal para todos los casos de infección del sistema de conductos con o sin periodontitis apical¹. Motivo por el cual se necesitan agentes seguros con un nuevo mecanismo de acción y propiedades físicas adecuadas para ser empleados como medicación intraconducto entre citas⁴.

La importancia del presente estudio radica en evaluar el efecto antimicrobiano de ODD-M en relación al Ca(OH)_2 , a la fecha no existe algún precedente en la literatura que compare ODD-M con agentes terapéuticos empleados como medicación intraconducto, sin embargo, existe el antecedente de que tanto el extracto del ajo como el óxido dialil disulfuro son efectivos en la eliminación de bacterias orales^{8,69,72}.

Para determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de ODD-M se realizó un estudio de sensibilidad antimicrobiana donde se comparó con diferentes agentes que reporta la literatura, han sido empleados como medicación intraconducto tales como Ca(OH)_2 , CHX, Clindamicina, además de un hidrogel a base de superoxidación, tomando como referencia los modelos experimentales realizados por Ballal y cols.⁹², Blanscet y cols.⁹³ y Pacios y cols.³⁶.

La formación de halos de inhibición de un medicamento depende de su toxicidad contra la bacteria con la cual se va a evaluar y la capacidad de difusión del medicamento en el medio³⁶. Chen y cols.⁸² mencionan que la prueba de difusión

agar es inadecuada para probar la eficacia antimicrobiana del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ya que este presenta baja solubilidad y no difunde bien en el medio, sin embargo, Siqueira y cols.⁹⁴ reportan que, bajo situaciones clínicas, la actividad buffer de la sangre, fluidos tisulares y la dentina, ejercen el mismo efecto.

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, los resultados mostraron que el hidrogel de ODD-M fue altamente efectivo al inhibir el crecimiento bacteriano de todas las cepas evaluadas. Presentando halos de inhibición en *S. aureus* de 19.91 ± 0.66 mm, *E. faecalis* 10.98 ± 0.63 mm, *C. albicans* 20.08 ± 0.8 mm y *S. mitis* de 11.58 ± 49 mm. La concentración de Accua aséptico® con el principio activo de ODD-M fue de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la cual está dentro del rango empleado en investigaciones previas (512 mg/ml con MIC 4-32 mg/ml y 220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con MIC 0.4-55 $\mu\text{g}/\text{ml}$)^{5,8}.

Bokaeian y Bameri⁵, reportan que el extracto acuoso del ajo a concentraciones entre 512 - 32 mg/ml presentan efecto antimicrobiano en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* con zonas de inhibición de 16.8 ± 1.8 mm, por lo que determinan que el extracto de ajo tiene efecto anti-enterococos significativo y respaldan su uso. En nuestro estudio los halos de inhibición que indujo ODD-M en las cepas de *E. faecalis* fueron de 10.98 ± 0.63 mm, lo cual corrobora el efecto antimicrobiano de los principios activos derivados del ajo. Es importante que los principios activos empleados como medicación intraconducto presenten efecto anti enterococos ya que la literatura reporta que esta especie bacteriana es la más asociada en la contaminación de conductos radiculares, biofilm extrarradicular y adhesión en los tubulillos dentinarios.

A pesar de todo esto la medicación intraconducto de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sigue siendo considerada como el estándar de oro. Blanscet y cols.,⁹³ reportan que las formulaciones de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 50-60% o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 35% con metilcelulosa acuosa (UltraCal Xs) inhiben bacterias endopatógenas como: *E. faecalis*, *S. sanguis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. endodontalis*, *P. nigrescens* y las recomiendan como medicación intraconducto. Además, algunos autores señalan en sus investigaciones que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ elimina *E. faecalis* efectivamente^{78,95-97}. Por otra parte, Law y

Messer⁹⁸ recomiendan el uso del Ca(OH)_2 para reducir la carga bacteriana en los conductos previo a la obturación.

En el presente estudio las pastas de Ca(OH)_2 , no formaron halos de inhibición en ninguna de las cepas evaluadas y no hubo diferencia estadística significativa entre la pasta de Ca(OH)_2 VIARDEN (0 ± 0 mm) y la pasta de Ca(OH)_2 ULTRADENT (0 ± 0 mm), se pudo observar que ambas pastas fueron capaces de difundir en el medio de cultivo y podríamos considerar que tuvieron un efecto bacteriostático mas no bactericida, debido que al evaluar los halos de inhibición de las pastas de Ca(OH)_2 al microscopio óptico se observaron colonias bacterianas dispersas dentro del área del halo de inhibición. Estos resultados concuerdan con los presentados por Pacios y cols.³⁶ quienes reportan que la pasta de Ca(OH)_2 con agua destilada presentó halos de inhibición de 0 ± 0^a para *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* aislado clínicamente. Contrario a esto Ballal y cols.⁹² reportan halos de inhibición de 9 mm para *E. faecalis* y de 21.066 mm para *C. albicans* con la pasta de Ca(OH)_2 en proporción de 1:1.

Algunos investigadores han determinado que el biofilm de *E. faecalis* es capaz de crecer en presencia de Ca(OH)_2 ⁸². En estudios *in vitro* en órganos dentales inoculados con *E. faecalis* se ha demostrado que el Ca(OH)_2 con solución salina y polietilenglicol como vehículos son inefectivos para eliminar esta bacteria de los tubulillos dentinarios^{83,84}. Estudios *in vivo* demuestran que Ca(OH)_2 es insuficiente para eliminar la microbiota resistente después de la instrumentación químico mecánica^{85,86}. Por esta razón el hidrogel ODD-M analizado en el presente estudio podría ser a futuro, una excelente alternativa como medicación intraconducto.

En relación a los hidrogeles a base de CHX, Clindamicina y superoxidación que fueron utilizados como parámetros de control en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana, se destaca el efecto antimicrobiano de CHX en todas las especies bacterianas evaluadas. Uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue que al comparar los halos de inhibición entre CHX y ODD-M, se logró observar que no hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en las cepas de *S. aureus*,

E. faecalis y *C. albicans* y en las cepas de *S. mitis*, CHX presentó halos inhibitorios mayores a ODD-M ($P > 0.05$), sin embargo, esto demuestra que el hidrogel a base de ODD-M presenta efectividad antimicrobiana muy similar a la CHX.

Basado en nuestros resultados, se puede sugerir al hidrogel de ODD-M como un buen candidato para seguir siendo evaluado bajo otros modelos experimentales hasta llegar a establecer un modelo de estudio *in vivo* para determinar si puede ser empleado como medicación intraconducto en casos de necrosis pulpar con o sin lesión periapical debido a la efectividad antimicrobiana que presentó bajo las condiciones de este estudio. Cabe señalar que no se busca reemplazar el uso del Ca(OH)_2 , pero si comenzar a investigar otras opciones que permitan eliminar los microorganismos y sus metabolitos activos, de una manera más eficaz del sistema de conductos y brindarle al especialista en Endodoncia la posibilidad de implementar nuevos principios activos que le permitan obtener resultados más predecibles en el tratamiento endodóntico.

11. CONCLUSIÓN.

El tratamiento endodóntico *per se* representa un reto para el clínico, y aún más cuando se enfrenta a casos que involucran un proceso infeccioso, en la actualidad a pesar de contar con múltiples opciones de instrumentos, soluciones irrigadoras, técnicas de irrigación, medicación intraconducto y demás complementos para el especialista en endodoncia es difícil tratar estas condiciones, debido a que en muchas ocasiones no se obtienen los resultados deseados y el tratamiento fracasa o no hay una respuesta tisular favorable.

Con esta investigación se pretende marcar una pauta en el tratamiento de conductos para salir del estándar, poder conocer nuevos medicamentos que se puedan emplear en casos específicos y obtener resultados más predecibles en el tratamiento endodóntico.

En este estudio el hidrogel a base de ODD-M presentó un efecto antimicrobiano *in vitro* similar al hidrogel de CHX, lo cual lleva a pensar que este hidrogel podría ser un buen candidato a emplear en el tratamiento endodóntico para complementar la desinfección del sistema de conductos de una manera más efectiva. Es importante señalar que en comparación con el $\text{Ca}(\text{OH})_2$, su eficacia antimicrobiana fue superior.

El hidrogel de ODDM cuenta con propiedades antimicrobianas que lo hacen un posible candidato para ser empleado como medicación intraconducto, sin embargo, se deben realizar estudios clínicos aleatorizados controlados complementarios previos para su uso *in vivo*.

12. REFERENCIAS.

1. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007; 52:(1) 64-82.
2. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32(5): 361-369.
3. Mohammadi Z, Shalavy S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J.* 2012; 48(3):133-140.
4. Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of root canal infections. *Prim Dent J.* 2016; 5(2): 84-89.
5. Bokaeian M, Bameri Zakaria. *In vitro* antibacterial properties of aqueous garlic extract (AEG) against multidrug-resistant Enterococci. *Zahedan J Res Med Sci.* 2013; 15(6): 43-49.
6. Shahnza A, Javed K, Nasim A. Study of synergistic effect of Allicin with antibacterials against microorganisms. *ANNALS.* 2009; 15(3): 138-140.
7. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed.* 2014; 4(1): 1-14.
8. Bakri I, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(7): 645-651.
9. Mikaili P, Madirad S, Moloudizargari M, Aghajanshakeri Sh, Shadi Sarahroodi. Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic shallot, and their biologically active compounds. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(10): 1031-1048.
10. Majewski M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2014; 65(1): 1-8.

11. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*. 1999; 1(2): 125-129.
12. Armendáriz Borunda JS, inventor; Composición tópica semisólida conteniendo pirfenidona y dialil óxido de disulfuro modificado (odd-m) para eliminar o prevenir acné. México patente WO2013147577A1. 2013. Octubre 3.
13. López-Marcos JF. Aetiology, classification and pathogenesis of pulp and periapical disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9: 52-62.
14. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014; 40(5): 670-677.
15. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald Rj. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 30(3): 340-349.
16. Manzur A, González MA, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial Quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007; 33(2): 114-118.
17. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *J Endod*. 2007; 33(9): 788-795.
18. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe*. 2017; 48: 12-18.

19. Agrafioti A, Tzimpoulas NE, Kontakiotis EG. Influence of dentine from the root canal walls and the pulp chamber floor on the pH of intracanal medications. *J Endod.* 2013; 39(5): 701-703.
20. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal.* 2008; 10(1): 4-9.
21. Aw V. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J.* 2016; 42(2): 53-59.
22. March Rosselló GA, Eiros Bouza JM. Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med Clin (Barc).* 2013; 141(8): 353-357.
23. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community of Dentistry.* 2015; 5(1): 1-12.
24. Cervantes García JB, Cortés Rodríguez J, Ruíz Reyes H, Calderón Rojas BM. Análisis de las características morfo-funcionales y estructurales del biofilm presente en conductos radiculares. *Endodoncia Actual.* 2018; 12(03): 16-20.
25. Haapasalo M, Quian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod.* 2007; 33(8): 917-925.
26. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics.* 2004; 9(1): 27-36.
27. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J.* 2013; 36(2): 59-70.
28. Siqueira JF Jr, Roças N. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 July; 88(11): 969-981.
29. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endodontic Topics.* 2003; 6(1): 135-159.

30. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(5): 308-320.
31. Vidana R, Sullivan Å, Billström H, Alquist M, Lund B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals-host derived or exogenous source? *Letters in Applied Microbiology*. 2010; 52(2): 109-115.
32. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011; 44(8): 697-730.
33. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium Hydroxide: a review. *Int Dent J*. 2005; 55(5): 293-301.
34. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999; 32(4): 257-282.
35. Ballal NV, Shabi GV, Kumar MR, Kundabala M, Bhat KS. In vitro sustained release of calcium ions and pH maintenance from different vehicles containing calcium hydroxide. *J Endod*. 2010; 36(5): 862-866.
36. Pacios MG, Silva C, López ME, Cecilia M. Antibacterial action of calcium hydroxide vehicles and calcium hydroxide pastes. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2012; 3(4): 264-270.
37. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*. 2012; 61(9): 399- 419.
38. Karpinski T, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(7): 1321-1326.
39. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009; 42(4): 288-302.
40. Calderón Rojas BM, Loeza Ramírez MA, Ruíz Reyes H. Análisis fisicoquímico de la interacción hipoclorito de sodio y clorhexidina. *Endodoncia Actual*. 2013; 8(1): 30-35.

41. Tervit C, Paquette L, Torneck CD, Basrani B, Friedman S. Proportion of healed teeth with apical periodontitis medicated with two percent chlorhexidine gluconate liquid: a case series study. *J Endod.* 2009; 35(9): 1182-1185.
42. Vergara Arrieta M, Díaz Caballero A, Albear J. Eficacia de la pasta triantibiótica en conductos radiculares infectados con *Enterococcus faecalis*. Revisión de la literatura. *Ciencia y Salud Virtual.* 2013; 5(1):103-108.
43. Montero-Millares P, González JM, Ezpeleta OA, Jiménez-Sánchez MC, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontic procedures: a review. *Int Endod J.* 2018; 51(9): 981-988.
44. Adl A, Hamed S, Shams SM, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J.* 2014; 9(2): 123-126.
45. Segura-Egea JJ, Gould K, Hakan Şen B, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, Sunay H, Tjäderhane L, Dummer PMH. Antibiotics in endodontics: a review. *Int Endod J.* 2017; 50(12): 1169-1184.
46. Sabrah AHA, Yassen GH, Gregory RL. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod.* 2013; 39(11): 1385-1389.
47. Pallota RC, Ribeiro MS, de Lima Machado ME. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J.* 2007; 33(3):107-111.
48. Karczeuski A, Feitosa SA, Hamer EI, Pankajankshan D, Gregory RL, Spolnik KJ, Bottino MC. Clindamycin-modified triple antibiotic nanofibers: a stain-free antimicrobial intracanal drug delivery system. *J Endod.* 2018; 44(1): 155-162.
49. Caviedes J, Estévez M, Rojas Páez PA. Antibióticos en el manejo de las infecciones odontogénicas de origen endodóntico. *Odontología Actual.* 2008; 6(61); 38-52.

50. Ravikumar K, Sridhar B. Clindamycin Hydrochloride monohydrate and its ethanol solvate. *Acta Cryst.* 2010; 66(2): 97-100.
51. Falagas ME, Gorbach SL. Clindamycin and Metronidazole. *Medical Clinics of North America.* 1995; 79(4): 845-867.
52. Brook I, Lewis MAO, Sándor GKB, Jeffcoat M, Samaranayake LP, Vera Rojas J. Clindamicina para el tratamiento de infecciones dentales. *Revista ADM.* 2007; 64(6): 230-237.
53. Smieja M. Current indications for the use of Clindamycin: a critical review. *Can J Infect Dis.* 1998; 9(1): 22-28.
54. Molander A, Reit C, Dahlén G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1990; 23(2): 113-118.
55. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a Clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod.* 1999; 25(11): 722-727.
56. Rector N, Guerrero del Ángel F, de la Garza Ramos MA, Cabral Romero C, Parra RO, Téllez Jiménez H. Efectividad *in vitro* de la Clindamicina Gel sobre bacterias periodontopatógenas. *Oral.* 2012; 13(43): 919-926.
57. Romano-Pérez L, González-Espinoza D, Núñez-Ochoa L, Landa-Solís C, Gutiérrez AA. Solución de Super-Oxidación Microdacyn 60. Una tecnología para tratar heridas. Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud de México, Facultad de Medicina y Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México; 2005; 1-15.
58. Mena-Mendivil ED, Flores-Treviño JJ, Rodríguez-Delgado I, de la Garza-Ramos MA, Torre-Martínez HH, Martínez-González GI. Antimicrobial effect of Microdacyn 60, Oxoral and sodium hypochlorite 5.25% in anaerobic bacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy.* 2013; 5(6): 114-119.

59. Durán Vega HC. Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Dol Foro Nal Invest Clín Méd.* 2010; 7(3): 4-8.
60. Sakarya S, Gunay N, Karakulak M, Ozturk B, Ertugrul B. Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm and wound healing potency. *WOUNDS.* 2014; 26(12): 342-350.
61. Stein E. Efectividad de la irrigación supra y subgingival con una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro. *Odontología Actual.* 2012; 8(108): 50-54.
62. Lafauri GI, del Rosario AM, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millán LV, Calderón J, Nieves Ruíz B. Eficacia desinfectante del Ácido Hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología.* 2009; 1(1): 3-11.
63. Flores MA. Solución electrolizada por selectividad iónica de pH neutro en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Revista Mexicana de Odontología Clínica.* 2009; 2(12): 16-22.
64. Isaa A. Katime, Katime O, Katime D. Materiales inteligentes: Hidrogeles macromoleculares. Algunas aplicaciones biomédicas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 2005; (4): 35-50.
65. Echeverri CE, Vallejo C, Londoño ME. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas. *Revista EIA.* 2009; 6(12): 59-66.
66. Arredondo Peñaranda A, Londoño López ME. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación de medicamentos. *Revista de Ingeniería Biomédica.* 2009; 3(5): 83-94.
67. ACCUA Aseptic, Monografía de producto.

68. Davis SR. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products- the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses*. 2005; 48(2): 95-100.
69. Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z, Steinberg D. Garlic Allicin as a Potential Agent for Controlling Oral Pathogens. *Journal of Medicinal Food*. 2011; 14(11); 1338-1343.
70. Khodavandi A, Alizadeh F, Harmal NS, Sidik SM, Othman F, Sekawi Z, Jahromi AF, Ng KP, Chong PP. Comparison between efficacy of allicin and fluconazole against *Candida albicans in vitro* and in systemic candidiasis mouse model. *FEMS Microbiology Letters*. 2011; 315(2): 87-93.
71. Borjan-Mojabi K, Sharifi M, Karagah T, Karimi H. Efficacy of different concentrations of garlic extract in reduction of oral salivary microorganisms. *Arch Iran Med*. 2012; 15(2): 99-101.
72. Velliyagounder K, Ganeshnarayan K, Velusami SK, Fine DH. *In vitro* efficacy of diallyl sulfides against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5): 2397-407.
73. Zaragoza Meneses MTdJ, López Badillo LE, Rodríguez Martínez D. Comparación del efecto antimicrobiano de dos soluciones esterilizantes de Superoxidación con pH neutro. *Odontología actual*. 2012; 9(110): 38-40.
74. Lihua L, Jianhui W, Yayin L, Guanxin L. Effects of Allicin in the formation of *Pseudomona aeruginosa* Biofilm and the production of Quorum-Sensing controlled virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*. 2013; 62(3): 243-251.
75. Ponnuswamy TK, Jeyalakshmi S. Antibacterial activity of Allicin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) an *in vitro* study. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2017; 4(1): 308-310.
76. Quispe Yurja HE, Valencia Callejas S. Configuración interna de la Cámara Pulpar. *Revista de Actualización Clínica*. 2012; 21: 1045-1050.

77. Persoon IF, Crielaard W, Özok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2017; 50(11): 1055-1066.
78. Delgado R Jr, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, García RB, Bramante CM, Campanelli AP, Bernardineli N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36(8): 1389-1393.
79. Alturaiki S, Lamphon H, Edrees H, Ahlquis M. Efficacy of 3 different irrigation systems on removal of calcium hydroxide from the root canal: a scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2015; 41(1): 97-101.
80. Ma J, Shen Y, Yang Y, Gao Y, Wan P, Gan Y, Patel P, Curtis A, Khakpou M, Haapasalo M. *In vitro* study of calcium hydroxide removal from mandibular molar root canals. *J Endod.* 2015; 41(4): 553-558.
81. Keskin C, Sariyilmaz E, Sariyilmaz Ö. Efficacy of XP-endo finisher file in removing calcium hydroxide from simulated internal resorption cavity. *J Endod.* 2017; 43(1): 126-130.
82. Chen EW, Carey AJ, Ullet GC, George R. Characterisation of the efficacy of endodontic medications using a three-dimensional fluorescent tooth model: An *ex vivo* study. *Aust Endod J.* 2015; 41(2): 88-96.
83. Siqueira JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22(12): 674-676.
84. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J.* 2003; 36(4): 267-275.

85. Peters LB, van Winkellhoff AJ, Buijjs JF, Wasselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*. 2002; 35(1): 13-21.
86. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015; 41(6): 824-830.
87. Lindgren P, Eriksson KF, Ringberg A. Severe facial ischemia after endodontic treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 60(5): 576-579.
88. De Bruyne MAA, De Moor RJG, Raes FM. Necrosis of the gingiva caused by calcium hydroxide: a case report. *Int Endod J*. 2000; 33(1): 67-71.
89. Gómez Sosa M, Ruíz Reyes H. Efecto antimicrobiano del óxido dialil disulfuro modificado en biofilm procedente de aparatología ortodóncica. [Tesis]. Morelia: División de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2017.
90. Rangel León SM, Ortiz Madrigal JM, Ruíz Reyes H, García Chávez LY. Comparación en la remoción de un hidrogel a base de solución de ácido hipocloroso como medicación intraconducto en relación al hidróxido de calcio. [Tesis]. Morelia: División de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2018.
91. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008; 34(11): 1291-1301.
92. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J*. 2007; 52(2): 118-121.
93. Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG. An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. *J Endod*. 2008; 34(8): 1246-1248.

94. Siqueira JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of Chlorhexidine, Metronidazole, and Calcium Hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997; 23(3): 167-169.
95. Sjögren U, Figdor D, Spånberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24(3): 119-125.
96. Valera MC, Silva KCGda, Maekawa LE, Carvalho CAT, Koga-ito CY, Camargo CHR, Lima RS. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(6): 555-559.
97. Atila-Pektaş B, Yurdakul P, GülmezD, Görduysus Ö. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *Int Endod J.* 2013; 46(5): 413-418.
98. Law A, Messer H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod.* 2004; 30(10): 689-693.

13. ANEXOS.

Tabla 15: Concentraciones de Alicina utilizada en estudios *in vitro* previos.

AUTOR/AÑO	CONCENTRACIÓN ALICINA	BACTERIAS	SENSIBILIDAD	ZONAS DE INHIBICIÓN
Bakri y Douglas 2004	220 µg/ml	<i>C. albicans</i> NCTC 3091	SENSIBLE	
	220 µg/ml	<i>E. faecalis</i>	SENSIBLE	
Bachrach y cols. 2011	600µg/ml	<i>A. oris</i> (ATCC 43146)	MENOS SENSIBLE	
	600µg/ml	<i>S. mutans</i> (ATCC 27351)	MENOS SENSIBLE	
	600µg/ml	<i>S. sobrinus</i> (ATCC 6715)	MENOS SENSIBLE	
	2400 µg/ml	<i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277)	RESISTENTE	
	300 µg/ml	<i>F. nucleatum</i> (ATCC 10953)	SENSIBLE	
	300 µg/ml	<i>A. actinomycetemcomitans</i> (ATCC 29523)	SENSIBLE	
Borhan-Mojabi y cols. 2012	40 mg/ml	BACTERIAS SALIVALES		
	70 mg/ml	BACTERIAS SALIVALES		
Velliyagounder y cols. 2012	10 µg/ml	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	SENSIBLE	
	1 µg/ml	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	SENSIBLE	
	0.1 µg/ml	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	SENSIBLE	
Zaragoza y cols. 2012		<i>S. aureus</i>	SENSIBLE	
		<i>S. mutans</i>	SENSIBLE	12mm
		<i>L. acidophilus</i>	SENSIBLE	
		<i>C. albicans</i>	SENSIBLE	
		<i>E. coli</i>	SENSIBLE	
		<i>Pseudomona sp</i>	SENSIBLE	
Bokaeian y Bameri 2013	512 mg/ml	<i>E. faecalis</i>	SENSIBLE	16.8 ± 1.8mm
	512 mg/ml	<i>E. faecium.</i>	SENSIBLE	
Lihua y cols. 2013	10 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>		
	128 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>		
Khodavandi y cols. 2011	0.05 a 25 µg mL ⁻¹	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	SENSIBLE	
Ponnuswamy y Jeyalakshmi 2017	1%	MRSA	SENSIBLE	27 mm
		MRSA	SENSIBLE	14 mm
		MRSA	SENSIBLE	15 mm