

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.
POSTGRADO DE ENDODONCIA.

**EFFECTIVIDAD DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICACIÓN
INTRACONDUCTO EN LA ELIMINACIÓN DE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.**

Trabajo especial presentado ante la
ilustre Universidad Central de
Venezuela por el Odontólogo César
David Castillo A. para optar al título
de Especialista en Endodoncia.

Caracas, Octubre 2011.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.
POSTGRADO DE ENDODONCIA.

**EFFECTIVIDAD DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICACIÓN
INTRACONDUCTO EN LA ELIMINACIÓN DE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.**

Autor: Cesar D. Castillo A.

Tutor: Prof. Miguel Ángel Aznar.

Caracas, Octubre 2011.

Aprobado en nombre de la
Universidad Central de Venezuela
por el siguiente jurado examinador.

(Coordinador) Nombre y Apellido.

FIRMA.

Nombre y Apellido.

FIRMA.

Nombre y Apellido.

FIRMA.

Observaciones: _____

Caracas, Octubre 2011.

DEDICATORIA.

A Dios Todopoderoso, por su presencia en cada día de mi vida.

A Sabrina, la persona más importante de mi vida, por su presencia, guía, empuje, soporte y apoyo incondicional en cada paso que he dado junto a ti.

Nunca tendré como agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mi Familia que me acompañó en esta aventura que significó la Especialización y que, de forma incondicional, me apoyaron en cada momento.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Aznar, profesor, tutor y sobre todo, amigo, por haber confiado en mi persona, por la paciencia ante mi inconsistencia, los consejos, el apoyo y por la dirección de este trabajo.

A mis profesores del Postgrado de Endodoncia de la UCV, que compartieron conmigo sus conocimientos y el amor por esta bella Especialidad: La Endodoncia.

Al Instituto de Biología Experimental (IBE) por facilitar sus instalaciones y materiales para la realización de este estudio.

A la Dra. Guillermina Alonso y a la Lic. Yusibeska Ramos, profesoras del IBE, por su paciencia, sus consejos y especialmente, sus conocimientos en el campo de la Microbiología, las cuales me guiaron en la planificación de la metodología de esta investigación.

A mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos casi 2 años de convivir dentro y fuera del salón de clase. Carol, Rachelle, Magda, Marianna, Erik, Samir, Elsa y Alessandra. Gracias.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad hago extensivo a ellos mi más sincero agradecimiento.

Gracias a mi Magna Casa de Estudios, la Universidad Central de Venezuela y a la Facultad de Odontología, por la dicha de vivir la experiencia de ser Ucevista y por la preparación, vivencias y enseñanzas para ser mejores profesionales.

Gracias a todos.

LISTA DE CONTENIDOS

	<u>Página</u>
VEREDICTO APROBATORIO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
IV. RESULTADOS.....	33
V. DISCUSIÓN.....	46
VI. CONCLUSIONES.....	50
VII. RECOMENDACIONES.....	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

	<u>Página</u>
Figura 1. Modelo de las etapas del desarrollo bacteriano de una Biopelícula.	7
Figura 2. Registro fotográfico de la medición de los dientes para su posterior estandarización a 15 mm.	24
Figura 3. Registro fotográfico de la colocación de la raíz en material de impresión de silicona para formar el molde.	26
Figura 4. Registro fotográfico del corte longitudinal realizado a cada raíz para exponer el SCR.	26
Figura 5. Registro fotográfico de la colocación de las mitades radiculares en el molde previamente formado en el material de impresión.	27
Figura 6. Registro fotográfico de la mitad radicular posterior al tratamiento con EDTA por 2 minutos.	27
Figura 7. Registro fotográfico de la metodología empleada para la inoculación de las bacterias dentro del SCR.	30

Figura 8. Registro fotográfico de la muestra después de 72 horas de incubación para la formación de biopelícula de <i>E. faecalis</i> .	30
Figura 9. Registro fotográfico de la metodología empleada para la inoculación del Ca(OH)_2 dentro del SCR.	31
Figura 10. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 1 en su dilución pura.	35
Figura 11. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 1 en su dilución de 10^{-2} .	36
Figura 12. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 2 en su dilución pura.	36
Figura 13. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 2 en su dilución de 10^{-2} .	36
Figura 14. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 2, diente 1 en su dilución pura.	39
Figura 15. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 2, diente 9 en su dilución de 10^{-1} .	39

Figura 16. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 8 en su dilución pura.	41
Figura 17. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 9 en su dilución pura.	41
Figura 18. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 10 en su dilución pura.	41
Figura 19. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 8 en su dilución pura.	43
Figura 20. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 9 en su dilución de 10^{-3} .	43
Figura 21. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 10 en su dilución pura.	43

LISTA DE TABLAS.

	<u>Página</u>
Tabla I. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i> , con un tiempo de exposición de 24 h.	37
Tabla II. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i> , con un tiempo de exposición de 7 días.	38
Tabla III. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i> , con un tiempo de exposición de 10 días.	40
Tabla IV. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i> , con un tiempo de exposición de 15 días.	42
Tabla V. Evaluación estadística de los resultados.	45

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.

Desde 1965, cuando Kakehashi y col., descubrieron que el desarrollo y progresión de la enfermedad pulpar y periapical estaba íntimamente relacionada a la presencia de bacterias dentro del sistema del conducto radicular (SCR) ⁽¹⁾. El objetivo fundamental de la terapia endodóntica ha consistido en la eliminación de la mayor cantidad de bacterias posibles; contando para ello con diversas técnicas y herramientas. El SCR es limpiado y conformado durante la preparación mecánica del mismo con el uso de limas tanto manuales como rotatorias, conjuntamente con el uso de soluciones irrigadoras. Adicionalmente se pueden utilizar medicamentos en el interior del conducto para complementar esta limpieza químico-mecánica, a fin de prevenir que las bacterias remanentes se recuperen y multipliquen, manteniendo un control sobre la infección. El medicamento más comúnmente utilizado es el Hidróxido de Calcio (Ca(OH)_2), el cual ha demostrado ampliamente su capacidad de reducir la carga bacteriana del SCR.

El propósito de esta investigación es determinar el período de tiempo mínimo necesario en el cual el Ca(OH)_2 logra reducir y controlar las bacterias localizadas dentro del SCR, con la finalidad de complementar la literatura existente al respecto y proporcionar mayor soporte científico sobre la permanencia del Ca(OH)_2 como medicación intraconducto.

1. Objetivo General.

Determinar el tiempo mínimo requerido de la medicación intraconducto Ca(OH)_2 para la erradicación del *Enterococcus faecalis* del SCR previamente infectado con una biopelícula bacteriana *in vitro*.

2. Objetivos Específicos.

- Evaluar la efectividad del Ca(OH)_2 en la reducción de la viabilidad de células de *E. faecalis* inmersas en la biopelícula bacteriana, en diferentes intervalos de tiempo.
- Evaluar cuantitativamente la eliminación de *E. faecalis*, presente en biopelícula bacteriana, del SCR posterior al uso del Ca(OH)_2 , en diferentes periodos de tiempo.
- Establecer un criterio de uso de la medicación intraconducto sustentado en su efecto sobre la biopelícula de *E. faecalis*.

II. MARCO TEÓRICO.

El tratamiento endodóntico tiene como objetivo principal la prevención y el control de la enfermedad pulpar y perirradicular. Dada la relevancia de los microorganismos en la patogénesis de las lesiones perirradiculares, está claro que el éxito de la terapia endodóntica depende de la reducción y la eliminación de los mismos. La preparación mecánica completa es considerada un paso esencial en la desinfección del SCR. Sin embargo, la eliminación total de estas bacterias es muy difícil de lograr ⁽²⁾.

Estudios anteriores, han demostrado que el SCR presenta numerosas variables anatómicas, las cuales impiden la limpieza y eliminación del tejido orgánico, considerado un posible sustrato para las bacterias remanentes, pudiendo afectar el pronóstico del tratamiento de conductos ⁽³⁾. Gutierrez y col en 1968, investigaron los resultados de la preparación mecánica del SCR, tanto microscópica como macroscópicamente, y encontraron que en un 33.66% de los casos preparados mecánicamente, no se eliminó en su totalidad el tejido pulpar del SCR. Concluyeron que hubo una alta incidencia de prolongaciones del SCR, istmos y otras características anatómicas que no fueron tocadas o tratadas por la instrumentación ⁽³⁾. Por su parte, Skidmore y col en 1971, estudiaron la morfología del SCR de los primeros molares inferiores en humanos, encontrando una gran frecuencia de variables anatómicas que dificultaban la limpieza y conformación del SCR ⁽⁴⁾.

La pulpa dental y los tejidos periapicales son tejidos estériles normalmente. La infección endodóntica resulta de la invasión y multiplicación de bacterias en la cavidad pulpar. Gomes y col en 2004 estudiaron la microbiota de los SCR infectados. Evaluaron las bacterias existentes en la infección primaria y secundaria. Encontraron un total de 224 bacterias viables pertenecientes a 56 especies. De las bacterias aisladas, el 70 % fueron bacterias anaerobias estrictas. Las bacterias más comúnmente aisladas fueron: *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11.7%), *Prevotella intermedia/nigrescens* (16.7%), *Porphyromonas gingivalis* (6.7%) y *Porphyromonas endodontalis* (5%). En los SCR con exudado purulento y tratamiento de conducto previo, encontraron *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* sp., *P. micros* y *F. necrophorum* ⁽⁵⁾.

A medida que la infección se propaga hacia la zona apical del SCR, las condiciones ambientales varían y por ende, la población bacteriana se modifica para adaptarse al entorno existente. Haapasalo y col en 1987, aislaron las bacterias que provocaban una periodontitis apical que presentaba un trayecto fistuloso. Los autores encontraron bacterias comunes y específicas del SCR o del trayecto fistuloso. Las bacterias aisladas fueron: *Fusobacterium* sp., *Eubacterium plauti*, *Bacteroides* sp., *Bacteroides*

intermedius, *Propionibacterium acnés*, *Cocos Anaerobios Gram-negativos*, *Peptostreptococcus sp.*, *Streptococcus microaerofilico* entre otros (6).

En otro estudio, Pinheiro y col en 2003, identificaron la microbiota bacteriana que se encontraba en el SCR de dientes con tratamiento de conducto defectuoso. Encontraron que la microbiota estaba limitada predominantemente a un número pequeño de especies Gram-positivas. El microorganismo más comúnmente aislado fue *E. faecalis* (7).

Las bacterias que conviven en el SCR forman comunidades complejas, que crecen dentro de una matriz de exopolisacáridos (EPS), llamadas biopelículas, capaces de adherirse a diferentes superficies (8). Estos microorganismos, secretan un exopolímero, que forma una matriz adherente, donde quedan incluidos y se organizan en colonias con diferentes requerimientos metabólicos; lo que los convierte en organizaciones únicas con gran heterogeneidad, ya que pueden estar conformados por bacterias, hongos y protozoos (9). Dentro de las biopelículas, existe diversidad en cuanto a microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno (8, 10). Las biopelículas se pueden desarrollar sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (11).

El componente mayoritario de una biopelícula es el agua, que puede representar hasta el 97% del contenido total. En menor cantidad se

encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN, enzimas y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana ⁽¹²⁾.

Se consideran cuatro incentivos potenciales detrás de la formación de la biopelícula bacteriana durante la etapa de infección del SCR:

- 1- Protección Ante las condiciones adversas por parte del hospedero (Defensa).
- 2- Fijación en las aéreas ricas en nutrientes (Colonización).
- 3- Aprovechamiento de los beneficios de la comunidad.
- 4- Utilización de la biopelícula como medio de crecimiento ⁽¹³⁾.

La biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad para esta unión inicial, depende de factores ambientales como la temperatura, el pH y factores genéticos que codifiquen las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas ⁽⁹⁾.

Las células inician su crecimiento y expansión sobre la superficie en una monocapa; mientras forman micro colonias. Luego cambian su comportamiento, dando lugar a la arquitectura compleja de la biopelícula madura. La formación de una biopelícula no es un proceso aleatorio, sino que sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco fases: 1- Adsorción reversible de la bacteria a la superficie, 2- Unión

irreversible, 3- Primera fase de maduración con crecimiento y división, 4- Segunda fase de producción del exopolímero y 5- Desarrollo final de la colonia con dispersión de las células colonizadoras ⁽⁹⁾. (Figura 1).

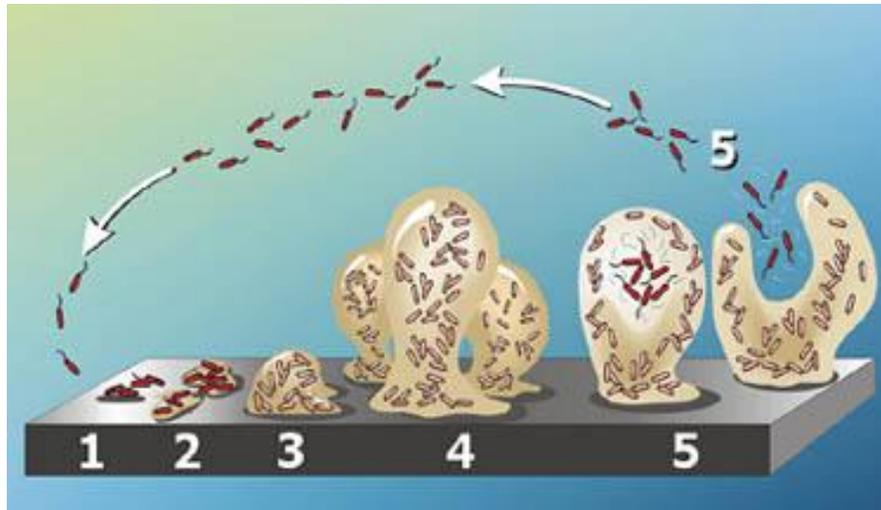


Figura 1. Un modelo de las etapas del desarrollo bacteriano de una Biopelícula. En la etapa 1, las células bacterianas se unen reversiblemente a la superficie. En la etapa 2, las células se unen de manera irreversible. En la etapa 3, la primera fase de la maduración se alcanza, según lo indicado por el desarrollo temprano de la arquitectura de la Biopelícula. La segunda fase de la maduración se alcanza en la etapa 4 con Biopelículas completamente maduras. En la etapa de la dispersión (5), las células planctónicas (células oscuras en la figura) se dispersan de las microcolonias (Tomado y modificado de Bethancourt y col., 2004.).

En una biopelícula madura hay una organización ideal en la administración de los recursos bioquímicos de todas las especies; se reúnen las diferentes enzimas de las especies bacterianas, con la finalidad de abastecerse de los aportes nutritivos que por sí solas no podrían digerir y como herramienta de defensa contra diversos antimicrobianos como los

biocidas. El mecanismo por el cual las bacterias son multirresistentes puede variar de una especie a otra (14).

Una de las bacterias que se relaciona mayormente con el fracaso del tratamiento endodóntico, es *E. faecalis* (7,15-25). Esto puede ser explicado debido a sus factores de virulencia, como por ejemplo, su habilidad de competir con otros microorganismos, soportar períodos prolongados sin nutrición, formar una biopelícula, invadir túbulos dentinarios, alterar la respuesta del hospedero, suprimir la acción de los linfocitos y resistir a medicamentos intraconductos (21).

E. faecalis es un coco Gram positivo que puede aparecer unitario, en pareja o en pequeñas cadenas. Son anaerobios facultativos, es decir, poseen la habilidad de multiplicarse en presencia o ausencia de oxígeno. Pueden metabolizar una gran variedad de fuentes de energía que incluyen los carbohidratos: 1,2,3 propanotriol o glicerina ($C_3H_8O_3$), lactato, malato, citrato, arginina y agmatina (26). Se encuentra principalmente en vastas cantidades en la luz del intestino humano, donde habita normalmente como bacteria residente y no causa daño en el hospedero (26). Estudios recientes demuestran que es una bacteria transeúnte de la cavidad bucal y puede volverse oportunista si se presentan las condiciones de colonización de su predilección, como conductos necróticos expuestos a la cavidad bucal o conductos obturados (27). Se ha sugerido que el transporte para llegar a la

cavidad bucal es la comida principalmente. Contrariamente a las otras especies, *E. faecalis* puede sobrevivir por sí sola y tolerar el estrés ambiental del SCR mejor que otras bacterias de su mismo género (27).

El oportunismo de *E. faecalis*, fue demostrado al investigar la prevalencia de la bacteria, en individuos con enfermedad dental y sin enfermedad dental. Los resultados corroboraron que las cepas de *E. faecalis* aisladas provenían de los individuos que presentaban enfermedad dental (28).

Como ya se ha mencionado en reiteradas ocasiones, el objetivo del tratamiento de conducto está direccionado hacia la eliminación de las bacterias que infectan el SCR; a través de diversos pasos, como la preparación mecánica del mismo, realizada con limas manuales o rotatorias, cuyas funciones principales son, entre otras, eliminar el tejido pulpar remanente, disminuir la carga bacteriana y preformar el conducto para facilitar la obturación. La preparación química, consiste en la utilización de sustancias desinfectantes dentro del SCR, siendo el más utilizado el Hipoclorito de Sodio (NaOCl), que elimina las bacterias químicamente, lubrica el conducto para facilitar el trabajo de las limas y elimina los desechos del SCR (29).

Byström y col. en 1981, demostraron que la preparación mecánica no logra eliminar por completo las bacterias, sino que las reduce considerablemente ⁽³⁰⁾.

De igual manera, En un estudio realizado por Shuping y col., en el 2000, se midió la reducción de las bacterias viables del interior del SCR infectados con la utilización de limas rotatorias y el uso del NaOCl al 1,25%. A su vez, se evaluó el efecto antibacterial de la adición de terapias de Ca(OH)_2 por 7 días. Los resultados indicaron que la instrumentación y la irrigación, son pasos importantes en la reducción de las bacterias del SCR durante el tratamiento endodóntico, sin embargo, no logran dejar consistentemente el SCR libre de bacterias. El autor aconseja la utilización del Ca(OH)_2 para ofrecer resultados más predecibles ⁽³¹⁾.

El Ca(OH)_2 ha sido usado para múltiples procedimientos endodónticos desde que fue descrito como un adjunto endodóntico por Hermann en 1920. También ha demostrado que en un vehículo acuoso, es el mejor y más efectivo agente antibacterial intraconducto ⁽³²⁾.

El Ca(OH)_2 es una sustancia alcalina, que tiene un valor de pH aproximadamente de 12,5. En una solución acuosa, el Ca(OH)_2 se disocia en iones de calcio (Ca^+) e iones hidroxilo (OH^-). Le han sido atribuidas diferentes propiedades biológicas a esta sustancia como lo son: Actividad

antimicrobiana; habilidad de disolución de tejidos; inhibición de procesos resorptivos del diente e inducción a la reparación del tejido duro ⁽²⁾. Se utiliza en terapias de dientes no vitales, incluyendo procedimientos de inducción al cierre apical; para dientes con una formación de la raíz incompleta e induce la formación de tejido duro para el sellado de las perforaciones producidas por resorciones radiculares internas. Además, los medicamentos a base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mantienen un valor de pH elevado, lo cual es importante para prevenir o inhibir la resorción radicular inflamatoria ⁽³³⁾. Otras aplicaciones del medicamento pueden ser: Como protector pulpar directo e indirecto y en pulpotomías vitales ⁽³²⁾.

La actividad antimicrobiana del $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se relaciona directamente a sus iones hidroxilos en un ambiente acuoso. El efecto letal sobre las células bacterianas se debe probablemente a los siguientes mecanismos: (a) Daño a la membrana citoplasmática bacteriana: Los iones hidroxilos inducen peroxidación lipídica, lo que resulta en la destrucción de fosfolípidos, componentes estructurales de la membrana celular. (b) Desnaturalización Proteica: El metabolismo celular depende de la actividad enzimática. La alcalinización dada por el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ induce la ruptura de las uniones de los iones que mantienen la estructura de las proteínas, como consecuencia las enzimas mantienen su estructura covalente pero los polipéptidos cambian su conformación; estos cambios frecuentemente resultan en la pérdida de la actividad enzimática y por ende en la interrupción del metabolismo celular. (c)

Daño al ADN: Los iones hidroxilos reaccionan con el ADN de la bacteria; consecuentemente, la replicación del ADN es inhibida y la actividad celular es alterada. Los radicales libres pueden también inducir mutaciones letales (2).

Algunos de los efectos benéficos del Ca(OH)_2 están particularmente dados por la capacidad de los iones OH^- de diseminarse a través de la dentina, cambiando el pH ácido en pH alcalino y también la acción realizada por los iones Ca_2^+ . Gomes y col, en el 2003, realizaron un estudio sobre la difusión de los iones Ca_2^+ a través de la dentina y obtuvieron que las pastas de Ca(OH)_2 tienen diferentes características de difusión de los iones Ca_2^+ , las cuales están directamente relacionadas con el tiempo y con los vehículos con los cuales se mezcla el Ca(OH)_2 (34).

Estos resultados fueron corroborados por los mismos autores un año después, donde estudiaron la difusión del Ca(OH)_2 asociado a diferentes vehículos. En este estudio concluyeron que, el diente puede actuar como una barrera para la difusión del medicamento sin bloquearlo por completo y no solamente pueden difundir el Ca_2^+ y OH^- a través de la dentina y alcanzar la superficie radicular exterior, sino que otros medicamentos también pueden hacerlo. Cada vehículo presenta diferentes características de difusión que están directamente relacionadas en la interacción con la estructura dentaria (35).

El vehículo que sirve de base para la pasta de Ca(OH)_2 condiciona la acción del medicamento, ya que dependiendo de su composición (acuoso o aceitoso), será mayor o menor la concentración de iones liberados hacia el medio externo y por ende puede afectar la concentración de difusión de los mismos a través de la dentina y hacia los tejidos periapicales. El vehículo también puede modificar el pH de la pasta de Ca(OH)_2 .

Pacios y col; (2004) estudiaron la influencia de los vehículos sobre el valor del pH en las pastas de Ca(OH)_2 y sus hallazgos corroboran que el vehículo utilizado si influye en el pH final de las pastas. Sus resultados, revelaron que la combinación del Ca(OH)_2 con agua destilada mostró el valor de pH más elevado, comparado con el resto de las pastas mezcladas con otros vehículos. También concluyeron, que el tipo de vehículo mostró influencia en el pH final de las pastas de Ca(OH)_2 , sin embargo la alcalinidad de las mismas se mantuvo constante todo el tiempo durante las condiciones del experimento ⁽³⁶⁾.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ferreira y col en el 2004, quienes evaluaron los niveles de pH y la liberación de iones de calcio en varias medicaciones de Ca(OH)_2 intraconducto, donde encontraron que el Calen[®] con paramonoclorofenol alcanforado y la pasta de Ca(OH)_2 con solución salina, exhibieron la mayor cantidad de iones liberados y los mayores niveles de pH ⁽³⁷⁾.

En otro estudio realizado por Geoffrey Robert y col. en 2005, fue evaluada la difusión apical del Ca(OH)_2 en modelos *in vitro*. Se obtuvo como resultado que las propiedades del vehículo que sirve de base para la pasta de Ca(OH)_2 , pueden modificar el efecto del medicamento en los tejidos periapicales (38).

En el 2005, Teixeira y col, realizaron un estudio donde midieron el pH en diferentes zonas de la dentina después de colocar el Ca(OH)_2 por dos métodos, con puntas de papel y con léntulos. Los autores obtuvieron como resultado que los valores de pH más altos en la pared del conducto y a 1 mm dentro de la dentina, fueron obtenidos cuando el Ca(OH)_2 fue colocado con el léntulo (39).

Algunas literaturas (40-42) han proporcionado información acerca del efecto del Ca(OH)_2 en la zona perirradicular, motivo por el cual es utilizado como medicamento intraconducto durante el tratamiento de las lesiones periapicales.

Caliskan y col, en 2004, realizaron una revisión clínica sobre los tratamientos de quistes periapicales de gran tamaño a través del tratamiento de conducto convencional. Observaron que en 42 dientes maduros anteriores con lesiones apicales grandes (7 – 18 mm), en los cuales se realizó terapias de Ca(OH)_2 , cambiadas cada 3 semanas y mantenidas por 3

meses, el 73,8% de los casos sanaron completamente y en un 9,5% no hubo procesos reparativos. Todos los casos tuvieron periodos de seguimiento de 2 a 10 años ⁽⁴⁰⁾.

Valois y col, 2005, reportaron un caso en el cual trataron una lesión perirradicular diagnosticada como quiste periapical con terapias de Ca(OH)_2 . El protocolo utilizado fue el de llevar más allá del ápice el Ca(OH)_2 para aprovechar sus ventajas antiinflamatorias, antibacteriales y la capacidad de formación de tejido duro. La pasta de hidróxido fue colocada en la primera cita posterior a una toma de muestra para cultivo y cambiada cada semana por un mes y luego mensual por 14 meses. Posteriormente fue obturado y dejado en observación. Los resultados también mostraron signos de reparación ⁽⁴¹⁾. Por su parte, Moor y col en 2002 concluyeron que debido a la alta alcalinidad de las pastas de Ca(OH)_2 , la sobreextensión dentro de la lesión perirradicular, resulta en una reacción inflamatoria de tejido. La extrusión extensa del Ca(OH)_2 dentro del tejido periapical aparentemente no compromete la reparación de la región. Sin embargo la sobreextensión no está indicada ⁽⁴²⁾.

Leonardo y col en el 2006, realizaron un estudio histológico sobre el efecto de los medicamentos intraconductos a base de Ca(OH)_2 en la reparación periapical. Como conclusión de este estudio obtuvieron que el uso de la medicación intraconducto a base de Ca(OH)_2 fue importante para la

reparación periapical en dientes con lesión periapical. El relleno del conducto con pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, entre citas, mejora la reparación apical, mucho más que en aquellos casos que fueron obturados en una sola sesión. Las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fueron dejadas por 15, 30 y 180 días donde no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tres periodos de tiempo (43).

Herrera y col en el 2006, reportan un caso en el cual utilizan el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por las propiedades de difusión de sus iones y su capacidad antiinflamatoria, para tratar la resorción radicular externa inflamatoria, la cual estaba ocurriendo en un diente autoimplantado, 3 meses después del acto quirúrgico. El protocolo utilizado fue, en la primera cita realizar el acceso y el instrumentado manual del SCR, luego de la irrigación fue colocado el $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se utilizó la pasta de hidróxido Calen[®] la cual fue cambiada cada 21 días por un período de 6 meses. Durante este tiempo, se observó radiográficamente una rápida sanación. Posterior a estas observaciones, se procedió a la obturación definitiva. Después de dos años de seguimiento, el diente se mantuvo asintomático y funcional (44).

Soares y col. en el 2006 reportaron un caso en el cual se trató un quiste periapical con terapias de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mezclado con anestésico local. Únicamente se le realizaron 4 recambios de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en un tiempo de 12 meses ya que el paciente no fue constante en su asistencia a las citas. Fue obturado con material provisional, al observar radiográficamente reducción

del tamaño de la lesión sin que presentara dolor ni exudado proveniente de éste. Un seguimiento de 14 meses indicó que el paciente evolucionaba favorablemente ⁽⁴⁵⁾.

Biológicamente hablando, la formación y persistencia de los abscesos apicales, granulomas y quistes están íntimamente asociadas con necrosis pulpares producidas dentro del SCR infectados. Por esto Soares y col en el 2007, estudiaron la actividad antibacterial residual de la Clorhexidina (CHX) y el Paramonoclorofenol alcanforado (PMCC) usados en las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Como resultado obtuvieron que la pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con CHX tiene mayor actividad antibacterial residual contra *Micrococcus luteus* que las pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con PMCC o anestésico local después de 21 días ⁽⁴⁶⁾.

Soares y col en el 2008, reportaron un caso en el cual usando terapias de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ combinado con PMCC, tuvieron respuesta favorable ante una lesión periapical extensa de aprox. 22 mm de diámetro. El protocolo que utilizaron fue dejar el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 11 meses aproximadamente, durante este tiempo se realizaron 6 recambios del medicamento ⁽⁴⁷⁾.

La literatura nos refleja diversas hipótesis acerca de la resistencia de algunas bacterias ante medicamentos intraconductos; tal es el caso de *E. faecalis*. Esta bacteria parece ser altamente resistente a los medicamentos utilizados durante el tratamiento endodóntico y es uno de los pocos

microorganismos que han demostrado *in vitro*, ser resistente al efecto antibacterial del Ca(OH)_2 (15, 17, 21, 48).

Stevens y col en 1983, estudiaron el efecto del Ca(OH)_2 como medicamento intraconducto en dientes de gatos *in vitro*, comparado con PMCC; su hipótesis se basaba en que el Ca(OH)_2 , debido a su alto valor de pH (12.2), no debería permitir el crecimiento bacteriano bajo dichas condiciones; sin embargo, concluyeron que bajo la forma de líquido sobrenadante, como lechada de Cal o como Pulpdent[®], no fue efectivo en la destrucción de *E. faecalis* (48).

Otro estudio que corrobora esta teoría es el de Distel y col en 2002, en el cual mediante Microscopio Electrónico por Escaneo (SEM por su siglas en ingles) y Microscopio con Laser Focal Por Escaneo (SCLM por sus siglas en ingles), se observó la colonización de *E. faecalis* en raíces extraídas y medicadas con Ca(OH)_2 ; concluyendo a través de estas observaciones que la biopelícula de *E. faecalis* es capaz de formarse *in vivo* en el SCR con terapia de Ca(OH)_2 (49).

Las siguientes razones han sido propuestas para explicar cómo *E. faecalis*, es capaz de sobrevivir en el SCR con terapia de Ca(OH)_2 : (a) *E. faecalis* mantiene pasivamente su equilibrio interno de pH; lo que ocurre como resultado de la penetración de iones a la membrana celular así como

de la capacidad buffer de su citoplasma. (b) *E. faecalis* posee una bomba de protones que provee un alcance adicional en la homeostasis del pH interno a través del bombeo de protones hacia dentro de la célula. (c) A un pH de 11.5 o más, *E. faecalis*, no es capaz de sobrevivir. Sin embargo, como resultado de la capacidad buffer de la dentina, no es común, que se pueda mantener un pH de 11.5 en los túbulos dentinarios con terapia de Ca(OH)_2 (21).

Sin embargo, diversas han sido las literaturas encontradas que sugieren la acción efectiva de la medicación intraconducto con Ca(OH)_2 en la erradicación de *E. faecalis* dentro del SCR.

Peciulien en el 2001, determinó la prevalencia de varias especies de *Enterococcus* en dientes tratados endodónticamente con periodontitis apical crónica; los resultados indicaron que *E. faecalis*, además de ser la bacteria más aislada, debe ser eliminada a través de la medicación intraconducto para tener éxito en el retratamiento endodóntico (17).

Yong en el 2001, colonizó raíces dentales con *E. faecalis*, colocándoles medicación intraconducto por 7 días, usando para la prueba de medicación: Pasta de Ca(OH)_2 acuosa y pasta de Ca(OH)_2 mezclada con aceite de silicona; colocadas en dos grupos: Con capa de desecho en las paredes del SCR y sin capa de desecho. Sus resultados demostraron que todas las pastas de Ca(OH)_2 fueron efectivas en la eliminación de la bacteria

en los túbulos dentinarios, excepto en el grupo con capa de desecho e Ca(OH)_2 mezclado en aceite de silicona (50).

Estrela y col., en el 2001, estudió la influencia de varios vehículos en la efectividad antimicrobiana del Ca(OH)_2 ante algunos microorganismos, entre los que se encontró *E. faecalis*. Los vehículos empleados fueron: Ca(OH)_2 + solución salina; Ca(OH)_2 + PMCC; Ca(OH)_2 + solución de CHX; Ca(OH)_2 + 3% de lauril sulfato de sodio e Ca(OH)_2 + Otosporin®. Bajo las condiciones del estudio concluyeron que el Ca(OH)_2 fue efectivo como antimicrobiano luego de 48 horas ante especies de *E. faecalis*; sin embargo, acotaron que, los vehículos empleados no influyeron en el tiempo requerido para la inactivación microbiana (51).

Evans y col en 2002, intentaron clarificar el mecanismo mediante el cual el alto valor de pH del Ca(OH)_2 no permite la supervivencia de *E. faecalis*. Sus resultados concuerdan que, a un valor de pH de 11.1 o menos, *E. faecalis* fue resistente a la acción del Ca(OH)_2 ; sin embargo, con un valor de pH de 11.5 se logró erradicar dicha bacteria (52). La difusión iónica del Ca(OH)_2 , debe exceder la capacidad buffer de la dentina, de manera de alcanzar altos niveles de pH para destruir la bacteria (2).

Lynne y col. en 2003, compararon la actividad *in vitro* de varias preparaciones médicas sobre *E. faecalis* en la dentina del conducto. Los

resultados sugirieron que el Ca(OH)_2 al 10% puede ser más efectivo que el Peridex[®] para la eliminación de *E. faecalis* de la dentina de los conductos (53).

Vianna y col., en el 2005, investigaron la susceptibilidad *in vitro* de los patógenos endodónticos hacia el Ca(OH)_2 combinado con diferentes vehículos. Fueron estudiadas diferentes mezclas de pastas de Ca(OH)_2 y el tiempo tomado para dar cultivos negativos dentro del conducto para los patógenos más comunes del SCR como por ejemplo *E. faecalis*, *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *Prevotella intermedia*. Llegaron a la conclusión que la pasta de Ca(OH)_2 necesita más tiempo para eliminar microorganismos anaerobios facultativos que los anaerobios estrictos. La pasta de Ca(OH)_2 que dio un cultivo negativo en menor tiempo fue aquella con PMCC con 6 horas, mientras que los demás vehículos tardaron un máximo de 24 horas para eliminar todos los microorganismos patógenos (54).

Estos hallazgos fueron comprobados por Chai y col en 2007, los cuales demostraron la susceptibilidad de la biopelícula de *E. faecalis* ante antibióticos e Ca(OH)_2 . Como resultado obtuvieron que únicamente la eritromicina, la oxitetraciclina y el Ca(OH)_2 consiguieron eliminar el 100% de la biopelícula de *E. faecalis* (55).

Tomando en cuenta toda la literatura consultada, se puede apreciar que no existe un criterio específico para la utilización del Ca(OH)_2 dentro del SCR, por este motivo, este trabajo de investigación pretende proporcionar mayor soporte científico para el criterio en la toma de decisión sobre la permanencia del Ca(OH)_2 como medicación intraconducto.

III. Materiales y Métodos.

A. Preparación de la muestra.

Para este trabajo se utilizaron 46 premolares permanentes monorradiculares, los cuales fueron extraídos previamente por razones ortodónticas o periodontales. Antes de la extracción dental, se conversó con el paciente y se le solicitó el consentimiento informado, tanto verbal como escrito, para la utilización de la pieza dentaria en el estudio. Una vez realizada la exodoncia, los dientes fueron colocados en un frasco con Formol al 10% (Facultad de Farmacia UCV, Fórmulas Magistrales Rp/92592) y se reservó hasta el momento de su uso.

Los criterios de exclusión considerados para la selección de los dientes, fueron los siguientes:

- ✓ Dientes con caries dental.
- ✓ Dientes fracturados.
- ✓ Dientes con alguna restauración
- ✓ Dientes con tratamiento de conductos previo.
- ✓ Dientes con ápices abiertos.

Posteriormente, se tomaron las medidas de todos los dientes (Figura 2) y se calculó un promedio de longitud para su estandarización, el cual fue de 15

milímetros. Se tomó dicha medida desde el ápice radicular en dirección coronal del diente y se removió la porción restante.



Figura 2. Registro fotográfico de la medición de los dientes para su posterior estandarización a 15 mm.

Una vez estandarizados los dientes, se procedió a la preparación químico-mecánica del SCR. La conductometría se realizó con una lima #10, hasta llegar al ras del foramen apical, se obtuvo la medida de la raíz y se le restó 1 mm para determinar la longitud de trabajo.

Se realizó la instrumentación de los conductos radiculares con limas M-Two[®] (VDW, Alemania) para sistema rotatorio hasta la lima 30/.05, siguiendo el protocolo de trabajo indicado por la casa del fabricante, la cual nos recomienda verificar la permeabilidad del conducto con una lima K #10 antes de comenzar la instrumentación rotatoria. Posteriormente se debe utilizar la secuencia básica, en primer lugar la lima 10/.04, seguida de la 15/.05, 20/.06 y 25/.06, hasta la longitud de trabajo, comprobando siempre que no exista ningún signo de fatiga y eliminando las virutas de dentina que

puedan estar entre las espiras de la lima, para aumentar la eficiencia de corte y disminuir el stress al que se somete el instrumento. Cuando se necesite instrumentar la porción apical hasta un calibre superior al 25, se pueden utilizar las limas del 30/.05, 35/.04 y/o 40/.04. También se puede utilizar la lima del 25/.07 cuando se desee darle una mayor conicidad a la preparación ⁽⁵⁶⁾.

La irrigación empleada durante la instrumentación fue hipoclorito de sodio al 3,25% (Nevex[®], Corporación Clorox de Venezuela), para finalizar se empleó abundante solución salina, eliminando los restos del irrigante previo.

Se obtuvieron 46 frascos de vidrio con tapa de rosca, los cuales fueron rellenados con acrílico (polvo/líquido en su proporción ideal) hasta el cuello de los mismos. Sobre éste se colocó material de impresión de silicona por adición (President[®], Coltene Whaledent, Suiza) hasta el borde superior de cada uno de los frascos y se sumergieron las raíces, asegurando que el extremo coronario de la raíz quedara al ras de la silicona (Figura 3). Se esperó su fraguado correspondiente.



Figura 3. Registro fotográfico de la colocación de la raíz en material de impresión de silicona para formar el molde.

Se identificó cada frasco y su respectiva raíz, para reubicarlas con facilidad. Cada raíz fue pincelada externamente con barniz de uña y posteriormente seccionada longitudinalmente a través del SCR con un disco flexible de diamante de 0,10mm de espesor (KG Sorensen[®], Brasil), con una herramienta rotatoria (Dremel[®], Robert Bosch Tool Corporation) (Figura 4). Las mitades radiculares se colocaron de nuevo en su molde de silicona para garantizar una buena aproximación (Figura 5).



Figura 4. Registro fotográfico del corte longitudinal realizado a cada raíz para exponer el SCR.



Figura 5. Registro fotográfico de la colocación de las mitades radiculares en el molde previamente formado en el material de impresión.

Ambas mitades radiculares se sumergieron en un frasco con EDTA al 17% (Secure[®]), durante 2 minutos (Figura 6), para la eliminación de la capa de desechos y posteriormente fueron sumergidas en una frasco con agua destilada por 1 minuto para detener la acción del quelante. Luego todas las mitades se colocaron en frascos rotulados para cada una de ellas, con agua destilada, por 2 horas para su hidratación y fueron esterilizadas en autoclave a 121°C por 20 minutos a 1 atm de presión.



Figura 6. Registro fotográfico de la mitad radicular posterior al tratamiento con EDTA por 2 minutos.

B. Preparación de la Inoculación.

Se empleó un liofilizado de la cepa *E. faecalis* (ATCC 29212), con el cual se prepararon cultivos bacterianos en 2 ml de caldo de Tripticasa de Soya (Merck®, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas a 37°C, para su activación. La Tripticasa de Soya utilizada para esta investigación, está compuesta por: 17 g de Peptona de Caseína, 3 g de Peptona de Harina de Soya, 5 g de Cloruro de Sodio, 2,5 g de Fosfato Di-Potásico, 2,5 g de Dextrosa y 1000 ml de Agua destilada. Transcurrido el tiempo mencionado, se tomó una muestra de Caldo bacteriano y se sembró por agotamiento en placas de Agar, incubándolas a 37°C durante 24 horas, para verificar la viabilidad de la bacteria y su grado de pureza. Posteriormente se tomó un grupo de bacterias puras, se inoculó en Caldo de Tripticasa de Soya y se llevó a la estufa con agitación durante 24 horas a 37°C.

Terminado este tiempo, se midió la Densidad Óptica en un biofotómetro (EPPENDORF®) y se obtuvo un valor de 1.606 lo que equivale a $5,79 \times 10^8$ células mL⁻¹. De esta suspensión se realizaron diluciones seriadas, tomando 100 µL de la suspensión inicial e inoculándolo en un tubo de ensayo que contenía 0,9 ml de caldo de Tripticasa de Soya estéril, obteniéndose una dilución de 10⁻¹. Posteriormente se tomó 100 µl de ésta y se inoculó en otro tubo de ensayo con 0,9 ml de caldo de Tripticasa de Soya estéril, obteniéndose una dilución de 10⁻². Se repitió la operación hasta llegar a una

dilución de 10^{-8} . Luego, se tomaron 100 μ l de cada una de las diluciones realizadas, se cultivaron mediante extensión de superficie en placas de Agar de Tripticasa de Soya y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Una vez cumplido el tiempo se realizó el conteo de las bacterias para obtener la titulación, que nos indica la cantidad de bacterias por unidad de volumen.

C. Inoculación de las bacterias.

A partir de una colonia previamente aislada de la cepa de estudio, se inocularon 2 ml de caldo de Tripticasa de Soya y se dejaron en incubación por 24 horas a 37°C. De esta suspensión se tomó 1ml y se mezcló con 4ml de caldo estéril que posteriormente fueron vertidos en una placa de Agar Tripticasa, en donde se encontraban las mitades de los dientes con la luz del conducto expuesta hacia la superficie de la placa durante 72 horas reemplazando el medio cada 24 horas (Figuras 7 y 8). A un grupo de 10 dientes se le realizó la misma metodología, pero a diferencia de los anteriores, no se inoculó bacterias, los cuales fueron utilizados para los grupos controles negativos.



Figura 7. Registro fotográfico de la metodología empleada para la inoculación de las bacterias dentro del SCR.



Figura 8. Registro fotográfico de la muestra después de 72 horas de incubación para la formación de biopelícula de *E. faecalis*.

Al término de las 72 horas, se removieron las muestras de la estufa. Las 92 mitades radiculares se colocaron de nuevo en su molde respectivo y se procedió a colocar el Ca(OH)_2 Ultracal (Ultradent, Estados Unidos) con léntulo N°. 30 según especificaciones ISO a los dientes que conformaran los grupos experimentales. (Figura 9).



Figura 9. Registro fotográfico de la metodología empleada para la inoculación del Ca(OH)_2 dentro del SCR.

Se realizó la división de los dientes en 6 grupos: Dos grupos controles con 3 dientes cada uno y 4 grupos experimentales con 10 dientes cada uno, de los cuales se utilizaron 8 para la experimentación, 1 control positivo (Diente 9) sin medicación intraconducto y 1 control negativo (Diente 10) al cual no se le inocularon bacterias; sin embargo, estos grupos controles fueron sometidos a las mismas condiciones que los 8 dientes experimentales. Los 6 grupos se dividieron de la siguiente manera:

- Grupo experimental 1: Se colocó como medicamento intraconducto Ca(OH)_2 por 24 horas.
- Grupo experimental 2: Se colocó como medicamento intraconducto Ca(OH)_2 por 7 días.
- Grupo experimental 3: Se colocó como medicamento intraconducto Ca(OH)_2 por 10 días.
- Grupo experimental 4: Se colocó como medicamento intraconducto Ca(OH)_2 por 15 días.

- Grupo control Positivo: Posterior a la inoculación no se colocó medicación intraconducto.
- Grupo control Negativo: no se inoculó ninguna bacteria dentro del conducto.

Posterior a la colocación del Ca(OH)_2 y la división de los dientes en los respectivos grupos, se procedió a colocar los frascos con las muestras en la estufa a 37°C por los tiempos definidos para cada grupo.

Una vez cumplido el tiempo establecido del medicamento, se tomaron las muestras, se colocaron en 3 ml de caldo de Tripticasa de soya y se sometieron a agitación con el vortex por 2 min. Posteriormente se almacenaron con agitación por 24 horas a 37°C para permitir el desprendimiento y crecimiento de las bacterias presentes en la solución. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^4 y se sembraron 100 μL de cada dilución en placas de agar de Tripticasa de Soya mediante extensión en superficie, las placas se almacenaron en la estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó la titulación de las mismas, mediante la fórmula matemática: **Titulo= FD X número de colonias/ volumen de siembra, en donde FD es el factor de dilución**. Esta fórmula se utiliza para saber la concentración de bacterias en una unidad de volumen.

El análisis estadístico de este estudio fue llevado a cabo a través de la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$). Al observarse diferencias significativas, se realizó la prueba de Dunn usada para comparar los grupos experimentales. Los resultados en general fueron calculados por la suma de todos los parámetros estudiados de cada grupo y luego realizando la comparación entre los grupos. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5 (Graphpad Software[®], Inc).

IV. RESULTADOS.

Uno de los resultados más importantes obtenidos en esta investigación y que nos permitió continuar con la realización de la misma, fue que, bajo las condiciones de este estudio, *E. faecalis* fue capaz de formar biopelícula bacteriana en las paredes de los conductos radiculares.

1. Dientes controles.

Bajo las condiciones utilizadas en este estudio, los resultados obtenidos permiten sugerir que en el grupo control positivo, los dientes utilizados presentaron bacterias viables hasta en una dilución de 10^{-5} .

En el grupo control negativo, los dientes utilizados no presentaron bacterias viables en ninguno de los casos. Evidenciándose el correcto uso de la aproximación experimental utilizada para la evaluación de los dientes; ya que sin bacterias no se promueve la formación de biopelículas y sin medicamento, no se genera la eliminación de las mismas.

2. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 de acuerdo a los períodos de tiempos evaluados.

2.1. Grupo Experimental 1.

Como se puede observar en los resultados tabulados en la tabla N°1, representado por dientes medicados con Ca(OH)_2 por 24 horas, presentó 5 de los 8 dientes evaluados con bacterias viables. De éstos, dos presentaron 2000 y 9000 bacterias, uno presentó 2×10^3 bacterias y dos con 4 y 8×10^4 bacterias respectivamente. Los tres dientes restantes no presentaron bacterias viables en ninguna de las diluciones, bajo las condiciones ensayadas. El diente control positivo presentó 40×10^4 bacterias viables. El diente control negativo no presentó bacterias viables en su solución.

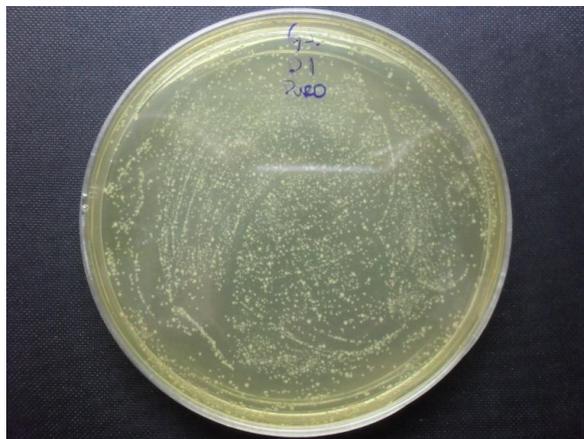


Figura 10. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 1 en su dilución pura.

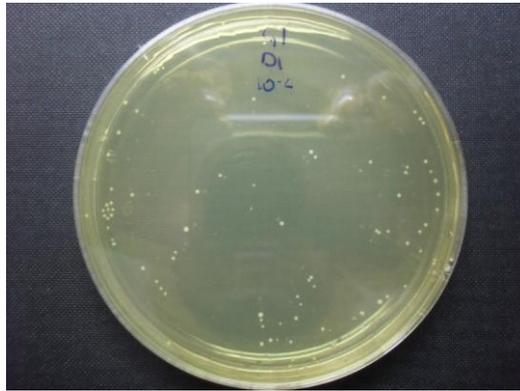


Figura 11. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 1 en su dilución de 10^{-2} .

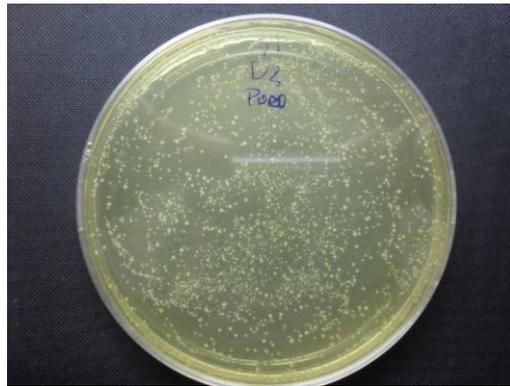


Figura 12. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 2 en su dilución pura.

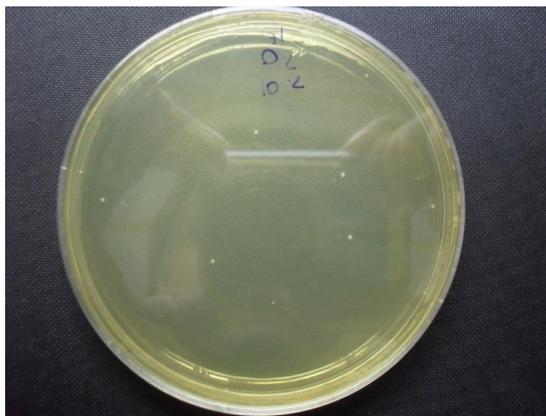


Figura 13. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 1, diente 2 en su dilución de 10^{-2} .

Tabla N°1. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de *E. faecalis*, con un tiempo de exposición de 24 h.

Grupo 1 (24 h).						
Diente	Puro	D=10 ⁻¹	D=10 ⁻²	D=10 ⁻³	D=10 ⁻⁴	Título
1	+	636	89	2	-	2x10 ⁴
2	+	118	9	-	-	9x10 ³
3	-	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	-	0
6	192	9	2	-	-	2x10 ³
7	+	+	528	X	8	8x10 ⁵
8	+	+	412	90	4	4x10 ⁵
9 control +	+	+	+	436	40	40x10 ⁵
10 control -	-	-	-	-	-	0

D=Dilución. - = Ausencia de crecimiento. + =Presencia de un césped bacteriano alrededor de toda la placa. x = Presencia de otros microorganismos en el material de estudio.

2.2. Grupo Experimental 2.

Como se puede observar en la tabla N° 2, representado por dientes medicados con Ca(OH)_2 por 7 días, se encontró presencia de bacterias, en solo 2 de los 8 dientes evaluados, específicamente en el diente N° 1 y 2, con títulos en el orden de 453×10^4 y 1444×10^4 respectivamente. Los seis dientes restantes no presentaron bacterias en sus diluciones, bajo las

condiciones evaluadas. El diente control positivo presentó 3219×10^4 bacterias y el diente control negativo no presentó bacterias viables.

Tabla N°2. Evaluación del efecto del Ca(OH)_2 sobre biopelículas de *E. faecalis*, con un tiempo de exposición de 7 días.

Grupo 2 (7 días).						
Diente	Puro	D=10 ⁻¹	D=10 ⁻²	D=10 ⁻³	D=10 ⁻⁴	Titulo
1	+	+	+	1432	453	453x10 ⁵
2	+	+	+	+	1444	1444x10 ⁵
3	-	-	-	-	-	0
4	X	-	-	-	X	0
5	-	-	-	-	-	0
6	X	-	-	-	-	0
7	-	-	X	-	-	0
8	-	-	X	X	-	0
9 control +	+	+	+	+	3219	3219x10 ⁵
10 control -	-	-	-	-	-	0

D=Dilución. - = Ausencia de crecimiento. + =Presencia de un césped bacteriano alrededor de toda la placa. x = Presencia de otros microorganismos en el material de estudio.

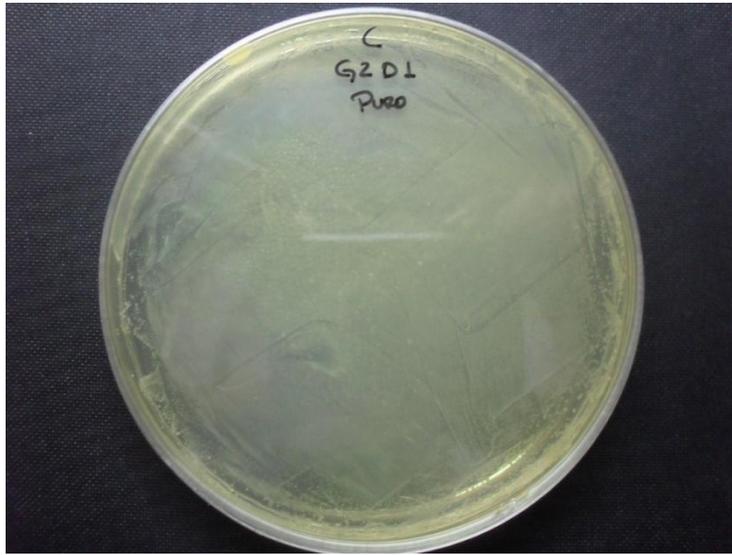


Figura 14. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 2, diente 1 en su dilución pura.

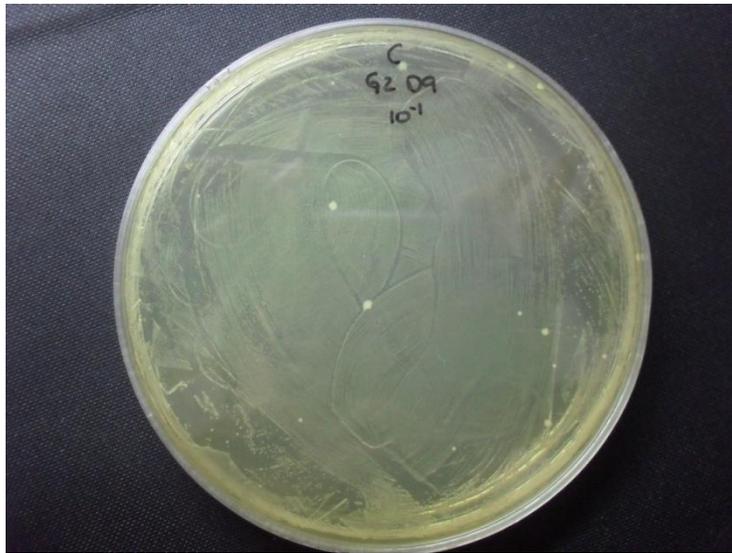


Figura 15. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 2, diente 9 en su dilución de 10^{-1} .

2.3. Grupo Experimental 3.

Como se puede observar en la tabla N°3, representado por dientes medicados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 10 días, ningún diente experimental presentó bacterias viables en sus diluciones. El diente control positivo presentó 15×10^4 bacterias y el control negativo no presentó bacterias viables.

Tabla N°3. Evaluación del efecto del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre biopelículas de *E. faecalis*, con un tiempo de exposición de 10 días.

Grupo 3 (10 días).						
Diente	Puro	D=10 ⁻¹	D=10 ⁻²	D=10 ⁻³	D=10 ⁻⁴	Título
1	-	-	-	-	-	0
2	-	-	-	-	-	0
3	-	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	-	0
6	-	-	-	-	-	0
7	-	-	-	-	-	0
8	-	-	-	-	-	0
9 control +	+	+	1764	184	15	15×10^5
10 control -	-	-	-	-	-	0

D=Dilución. - = Ausencia de crecimiento. + =Presencia de un césped bacteriano alrededor de toda la placa. x = Presencia de otros microorganismos en el material de estudio.



Figura 16. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 8 en su dilución pura.



Figura 17. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 9 en su dilución pura.



Figura 18. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 3, diente 10 en su dilución pura.

2.4. Grupo Experimental 4.

Como se puede observar en la tabla N° 4, representado por dientes medicados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 15 días, ningún diente experimental presentó bacterias viables en sus diluciones. El diente control positivo presentó 14×10^4 bacterias y el control negativo no presentó bacterias viables.

Tabla N°4. Evaluación del efecto del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre biopelículas de *E. faecalis*, con un tiempo de exposición de 15 días.

Grupo 4 (15 días).						
Diente	Puro	D= 10^{-1}	D= 10^{-2}	D= 10^{-3}	D= 10^{-4}	Título
1	-	-	-	-	-	0
2	-	-	-	-	-	0
3	-	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	-	0
6	-	-	-	-	-	0
7	-	-	-	-	-	0
8	-	-	-	-	-	0
9 control +	+	+	1260	176	14	14×10^5
10 control -	-	-	-	-	-	0

D=Dilución. - = Ausencia de crecimiento. + =Presencia de un césped bacteriano alrededor de toda la placa. x = Presencia de otros microorganismos en el material de estudio.

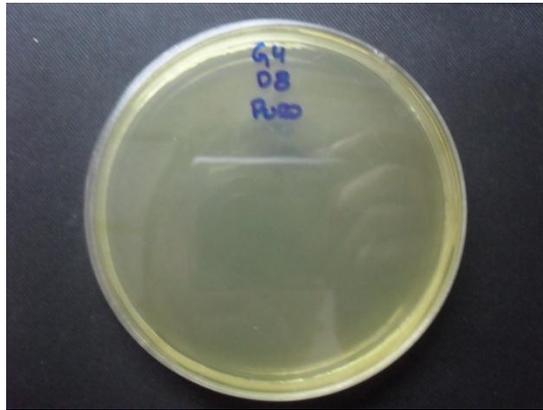


Figura 19. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 8 en su dilución pura.

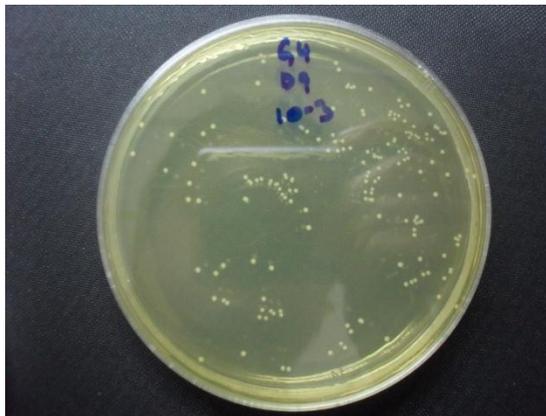


Figura 20. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 9 en su dilución de 10^{-3} .



Figura 21. Registro fotográfico de las placas de Agar con las colonias bacterianas del grupo 4, diente 10 en su dilución pura.

Bajo las condiciones específicas empleadas en este estudio, en todas las paredes del SCR a las que se les inoculó el caldo bacteriano, se formó biopelícula de *E. faecalis*. Todos los dientes de los grupos controles, demostraron la presencia o ausencia de bacterias viables, según cada caso, grupo control positivo y grupo control negativo respectivamente. En todos los dientes de los cuatro grupos experimentales, obtuvimos la presencia de bacterias viables de *E. faecalis*, en los grupos controles positivos (Dientes 9); por el contrario y como era de esperarse, no obtuvimos presencia de alguna bacteria viable en los grupos controles negativos (Dientes 10). De acuerdo al efecto antibacterial del Ca(OH)_2 sobre determinados períodos de tiempo, obtuvimos que al estar en contacto directo la medicación intraconducto con los microorganismos, disminuyó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. faecalis* a partir de los 7 días, comparado con los grupos controles. La persistencia de la viabilidad bacteriana bajo medicación intraconducto, perduró transcurridas las primeras 24 horas hasta los diez primeros días, aunque cabe destacar que disminuyeron en gran porcentaje las UFC. Un completo efecto antimicrobiano fue observado a partir de los 10 y hasta los 15 días de utilización del Ca(OH)_2 .

El análisis estadístico de los parámetros estudiados usando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, demostró mayor efectividad del Ca(OH)_2 en los grupos 3 y 4 (10 y 15 días respectivamente), comparado con los grupos

1, 2 (1 y 7 días respectivamente) y control positivo. Estableciéndose una diferencia significativa entre estos $P=0,0006$

Tabla N° 5. Evaluación estadística de los resultados.

Tabla de Análisis		
Prueba de Kruskal-Wallis		
Valor de P		0,0006
Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación de Gaussian	
Los Promedios varían significativamente? ($P < 0.05$)		Si
Numero de Grupos		5
Estadística de Kruskal-Wallis		19,57
Prueba de Comparacion Multiple de Dunn's	Difference in rank	Significativo? $P < 0,05$?
Control vs Grupo 1	10,63	No
Control vs Grupo 2	14,63	No
Control vs Grupo 3	20,00	Si
Control vs Grupo 4	20,00	Si
Grupo 1 vs Grupo 2	4,000	No
Grupo 1 vs Grupo 3	9,375	No
Grupo 1 vs Grupo 4	9,375	No
Grupo 2 vs Grupo 3	5,375	No
Grupo 2 vs Grupo 4	5,375	No
Grupo 3 vs Grupo 4	0,0	No

V. DISCUSIÓN.

Está demostrado que la relevancia de los microorganismos en la patogénesis de las lesiones perirradiculares es esencial; la terapia endodóntica está basada en la eliminación de dichas bacterias intrarradiculares. La mayoría de los casos de fracasos endodónticos, se piensa que envuelven una infección continua del SCR, que resulta en lesiones periapicales crónicas sucesivas al tratamiento de conducto (5-7).

La alta resistencia bacteriana ha sido bien documentada. *E. faecalis* es una bacteria comúnmente aislada de las lesiones periapicales de los dientes tratados endodónticamente (57). Se ha registrado su resistencia a la preparación químico-mecánica y a la acción del Ca(OH)_2 , ya que puede agruparse y formar una biopelícula; razón por la cual puede resistir el cambio de pH a alcalino, producido por el medicamento (58). Otra razón por la cual se utilizó esta bacteria en la metodología de investigación, fue por su fácil manipulación, fácil cultivo y por su capacidad de crecer en un ambiente de aerobiosis (50).

Estudios previos (2, 17, 59, 60) han demostrado la importancia en la medicación intraconducto entre sesiones con el fin de erradicar la mayor cantidad de bacterias, que probablemente con la preparación químico-mecánica, no se alcanza a eliminar.

En esta investigación fue evaluado el efecto antibacterial del Ca(OH)_2 en raíces dentales humanas, en diversos períodos de tiempo. El principal medicamento intraconducto representado por el Ca(OH)_2 , posee un mecanismo de acción antimicrobiano, que depende de sus iones OH^- y el tiempo de contacto y su acción directa o indirecta con los túbulos dentinarios. Está bien establecido que los iones hidroxilos poseen el efecto antibacterial; por lo tanto, se requieren altos niveles de pH para lograr tal efecto; es evidente que las pastas de Ca(OH)_2 exhibirán su efecto antimicrobiano en el SCR siempre y cuando se mantenga un alto valor de pH ⁽⁶¹⁾.

Idealmente el Ca(OH)_2 debe ser colocado de manera que abarque completamente la región apical del SCR y en cantidad suficiente que permita lograr el efecto biológico al estar en proximidad con los tejidos apropiados ⁽⁶²⁾. Es por ello que, en esta investigación, se utilizó el léntulo para llevar el Ca(OH)_2 al interior del conducto, basados en los resultados obtenidos por Sigurdsson en 1991 y Texeira en 2005, donde compararon diferentes tipos de técnicas para llevar el medicamento al interior del SCR, logrando mejores resultados con este instrumento ⁽³⁹⁾.

Cabe destacar que se debe relacionar el efecto antimicrobiano del Ca(OH)_2 , con el tipo de bacteria asociada, la localización del microorganismo

en el SCR, la presencia o ausencia de la capa de desecho dentinaria y la presencia o no, de exudado en el SCR ⁽⁶²⁾.

Es necesario considerar la microbiota encontrada en el SCR, la respuesta del hospedero y el mecanismo de acción del medicamento. Sin embargo, es imprescindible, que la medicación permanezca un tiempo suficiente dentro del SCR para que sea efectiva, que pueda actuar a distancia y neutralizar al agente agresor ⁽⁶⁴⁾.

El período requerido para que el Ca(OH)_2 pueda desinfectar el SCR es todavía desconocido y se han revelado resultados contradictorios. La exposición prolongada del medicamento, produce la saturación de la dentina y de los tejidos remanentes. Teóricamente, el tiempo prolongado de exposición del Ca(OH)_2 , debe ser necesario para obtener un SCR libre de bacterias. Byström en 1985, demostró previamente que la aplicación del Ca(OH)_2 para la eliminación bacteriana eficaz del SCR, resultó cuando se usó como medicamento intraconducto por un mes ⁽²⁹⁾. Sin embargo, en la terapéutica endodóntica, no parece ser una práctica aceptable, la medicación entre citas por largos períodos de tiempo ⁽²⁾.

Según las condiciones de este estudio, el Ca(OH)_2 es inefectivo para eliminar bacterias en períodos cortos de tiempo, tal como lo demostró

Sjögren y col., en 1991, quienes evaluaron la efectividad del Ca(OH)_2 utilizándolo como medicación intraconducto por un tiempo de 10 minutos comparado con 7 días. A partir del séptimo día, vieron cambios significativos en la cantidad de bacterias viables recolectadas de la muestra, lo que nos indica, que el medicamento fue efectivo en éste periodo de tiempo y no en su aplicación por 10 minutos ⁽⁵⁹⁾. Corroborando éstos resultados, Yong Han y col. en el 2001; demostraron que con el uso de Ca(OH)_2 mínimo por 7 días, se puede lograr una reducción significativa de la cantidad de bacterias ⁽⁵⁰⁾. Al contrario de estos hallazgos, Byström en 1985, observó que muchas de las bacterias comúnmente encontradas en necrosis pulpares, se erradicaban rápidamente cuando eran expuestas *in vitro* a una solución saturada de Ca(OH)_2 , por 1 a 6 minutos ⁽²⁹⁾. Cuando el Ca(OH)_2 fue aplicado *in vivo*, el material fue inefectivo en la destrucción de bacterias que persistían luego de la preparación químico-mecánica. La ineficacia del medicamento en períodos cortos de tiempo, se debía a la falla en que el medicamento alcanzara todas las regiones anatómicas en un período de tiempo de 10 minutos ⁽⁵⁹⁾. También encontramos las conclusiones de dos investigaciones de Estrela en el 2001, las cuales analizaron el efecto antimicrobial de pastas de Ca(OH)_2 sobre microorganismos seleccionados, entre los cuales se ubica *E. faecalis*, obteniendo una completa efectividad antimicrobiana después de 48 horas de colocado el medicamento ^(51, 57).

VI. CONCLUSIONES.

Para la realización de la presente investigación, fue seleccionada *E. faecalis*, por ser uno de los microorganismos más resistentes en el SCR y capaz de formar biopelícula bacteriana bajo las condiciones de este estudio.

La Terapia de Ca(OH)_2 como medicación intrarradicular, demostró ser efectiva en la disminución de la viabilidad de células de *E. faecalis* inmersas en biopelículas bacterianas.

Es necesario, siempre que sea posible, la terapia de Ca(OH)_2 por el tiempo que sea prudente, para que manifieste su potencial de acción sobre los microorganismos presentes en infecciones endodónticas.

Bajo los parámetros utilizados para realizar esta investigación, podemos concluir que el tiempo mínimo requerido para lograr el efecto antimicrobiano del Ca(OH)_2 , fue de 10 días. En este periodo de tiempo el medicamento demostró una completa eficacia en la eliminación del *E. faecalis* del SCR.

Se logra corroborar investigaciones anteriores donde afirman que la medicación intraconducto de Ca(OH)_2 por períodos cortos de tiempo, resulta ineficaz para la erradicación bacteriana. En un tiempo de 24 horas, no hubo

una diferencia significativa en el número de bacterias viables, en comparación a los grupos controles.

La metodología empleada para llevar a cabo la presente investigación, resultó ser útil como herramienta de trabajo para la obtención de los objetivos planteados.

VII. RECOMENDACIONES.

La importancia del uso del Ca(OH)_2 durante la terapia endodóntica se centra específicamente en sus elevadas propiedades biológicas; por lo tanto se deberían de realizar más investigaciones científicas con el fin de evaluar su incidencia sobre el pronóstico del tratamiento endodóntico en dientes con infección del SCR.

Según los resultados obtenidos, se recomienda la terapia de Ca(OH)_2 entre citas, para obtener una mayor desinfección del SCR.

De acuerdo a la presente investigación, se puede sugerir la terapia de Ca(OH)_2 con un tiempo mínimo requerido de 10 días entre sesiones, para obtener resultados más predecibles.

Se recomiendan estudios comparativos clínicos a futuro, que permitan corroborar y proporcionar mayores soportes científicos sobre la permanencia del Ca(OH)_2 dentro del SCR como medicamento intraconducto.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. 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; 20: 340-9.
2. Siqueira Jr J, Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32: 361- 9.
3. Gutiérrez J, García J Microscopic and macroscopic investigation on results of mechanical preparation of root canals *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 108-16.
4. Skidmore A, Bjorndal A. Root canal morphology of the human mandibular first molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971; 32: 778-84.
5. Gomes B, Pinheiro E, Gadé-Neto C, Sousa E, Ferraz C, Zaia A, *et al.* Microbiological examination of infected dental root Canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 71-76.
6. Haapasalo M, Ranta K, Ranta H. Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 83-85.
7. Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Souza-Filho F. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36: 1-11.
8. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.

9. Betancourth M, Botero J, Rivera S. Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb Med* 2004; 35: 34-39.
10. Vroom J, De Grauw K, Gerritsen H, Bradshaw D, Marsh P, Watson G, *et al.* Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 3502-11.
11. Watnick P, Kolter R. Biofilm, City of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182: 2675-9.
12. Branda S, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited *Trends Microbiol.* 2005; 13: 20-6.
13. Jefferson K. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 163-73.
14. Mah T, Pitts B, Pellock B, Walker G, Stewart P, O'Toole G. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 2003; 426: 306-10.
15. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86-93.
16. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.

17. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429-34.
18. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26: 593-5.
19. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.
20. Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad A. *Enterococcus* Spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31: 851-6.
21. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32: 93-8.
22. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; 32: 104-9.
23. Williams J, Trope M, Caplan D, Shugars D. Detection and Quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006; 32: 715-2.

24. Rôças I, Hülsmann M, Siqueira J. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008; 34: 926-31.
25. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño E. detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta Odontológica Venezolana* 2009; 47: 1-11.
26. Facklam R, Carvalho M, Teixeira L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of *Enterococci*. En: Gilmore M. *The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 1- 43.
27. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of *enterococci* in filled root canals. *Int Endod J* 2009; 42: 277–87.
28. Salah R, Dar-Odeh N, Hammad O, Shehabi A. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. *BMC Oral Health* 2008; 8: 17-24.
29. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18: 35-40.
30. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981; 89: 321-8.

31. Shuping G, Ørstavik D, Sirgurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000; 26: 751-5.
32. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36: 75-85.
33. Souza-Filho F, Soares A, Vianna M, Zaia A, Ferraz C, Gomes B. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 2008; 19: 28-33.
34. Camões IC, Salles MR, Chevitaese O. Ca_2^+ diffusion through dentin of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associated with seven different vehicles. *J Endod*. 2003; 29: 822-5.
35. Camões IC, Salles MR, Chevitaese O, Gomes LN. Diffusion of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). *J Endod* 2004; 30: 30-4.
36. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio MA, López ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci*. 2004; 46: 107-11.
37. Ferreira F, Rodriguez P, Sampaio M, Gomes I, Granjeiro J. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon* 2004; 97: 388-92.

38. Robert GH, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC. 3rd. Apical diffusion of calcium hydroxide in an *in vitro* model. J Endod 2005; 31: 57-60.
39. Teixeira FB, Levin LG, Trope M. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99: 511-6.
40. Caliskan M. Prognosis of large cyst-like periapical lesions following nonsurgical root canal treatment: a clinical review. Int Endod J 2004; 37: 408-16.
41. Valois C, Costa-Júnior E. Periapical cyst repair after nonsurgical endodontic therapy: case report. Braz Dent J 2005; 16: 254-8.
42. De Moor R, De Witte A. Periapical lesions accidentally filled with calcium hydroxide. Int Endod J 2002; 35: 946-58.
43. Leonardo M, Hernandez M, Silva L, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: 680-5.
44. Herrera H, Herrera H, Leonardo MR, de Paula e Silva FW, da Silva LA. Treatment of external inflammatory root resorption after autogenous tooth transplantation: case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: 51-4.

45. Soares J, Santos S, Silveira F, Nunes E. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. *Int Endod J* 2006; 39: 566–75.
46. Soares J, Leonardo M, Tanomaru M, Silva L, Ito I. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. *Braz Dent J*. 2007; 18: 8-15.
47. Soares JA, Brito-Júnior M, Silveira FF, Nunes E, Santos SM. Favorable response of an extensive periapical lesion to root canal treatment. *J Oral Sci*. 2008; 50: 107-11.
48. Stevens R, Grossman L. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 1983; 9: 372-5.
49. Distes J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-93.
50. Yong G, Park S, Cheol T. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis in vitro*. *J Endod* 2001; 27: 328-32.
51. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J*. 2001; 34: 341-5.
52. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002; 35: 221-8.

53. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. *In vitro* antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. J Endod 2003; 29: 187-90.
54. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz Dent J. 2005; 16: 175-80.
55. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. J Oral Sci. 2007; 49: 161-6.
56. Fagundo C, Contreras Z, De Ribot J. Sistema Mtwo Niti (Vdw® Endodontic Synergy): Técnica Clínica. Rev Oper Dent Endod 2007; 5:81.
57. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998; 31: 1-7.
58. Chávez L, Bergenholtz G, Dahlén G, Svensäter G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. Int Endod J 2007; 40: 344–55.
59. Estrela C, Rodriguez C, Luschke L, Djalma J. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. J Endod 2001; 27: 720-3.

60. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
61. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J* 1995; 28: 285 – 9.
62. Teixeira FB, Levin LG, Trope M. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 511-6.
63. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: Study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 2003; 11: 269- 82.



Anexo 1.



CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE LA PARTICIPACION EN UNA INVESTIGACION BIOMEDICA EN SERES HUMANOS EN EL POSTGRADO DE ENDODONCIA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UCV.

Yo, _____, de _____ edad, identificado con la cedula de identidad N° _____, domiciliado(a) en _____ como representante legal o familiar de _____, declaro lo siguiente:

He sido informado(a) por parte de el/la Odontólogo _____ (estudiante del Postgrado de Cirugía Bucal de dicha Institución) que la atención brindada es de tipo docente-asistencial, caracterizada por la atención odontológica a cargo de odontólogos bajo la supervisión clínica de docentes-especialistas.

Me han explicado en forma clara y suficiente, el diagnóstico, la naturaleza de la enfermedad que padezco o padece mi representado y su evolución natural, objetivos del tratamiento propuesto, así como las alternativas de tratamiento (sobre lo cual pude participar), descripción de las consecuencias derivadas del tratamiento o intervención, beneficios, riesgos comunes del tratamiento (posibles complicaciones que se pueden desencadenar durante o después del mismo), riesgos personalizados (por presentar problemas de salud general que incidan sobre el tratamiento) por lo que debo acudir al centro sanitario y buscar al médico tratante en el caso de desencadenarse algún riesgo, adicionalmente debo presentar el informe médico correspondiente para anexarlo a la historia clínica y seré informado(a) en cada momento y a mi requerimiento de la evolución del proceso.

Me han explicado en forma clara y suficiente, sobre la participación en una investigación realizada por el Odontólogo Cesar Castillo del Postgrado de Endodoncia de dicha Institución, en la que se recolectarán premolares extraídos por razones ortodónticas, la cual no afectará el protocolo de tratamiento indicado.

Acepto la realización de las radiografías, fotografías, y otros medios diagnósticos que sean necesarios para documentar la investigación; garantizándome la confidencialidad, el resguardo de mi identidad o la de mi representado y la utilización de dichos record sólo con fines académicos e investigativos.

Diagnóstico(s) _____
Tratamiento(s) por realizar _____
Tratamientos alternativos _____
Riesgos y complicaciones inherentes al tratamiento _____
Beneficio esperado con el tratamiento por realizar _____
Riesgos y complicaciones en caso de no efectuarse el tratamiento _____

He recibido información respecto al plan de tratamiento y autorizo al odontólogo _____ a extraer los siguientes dientes _____. Comprendo los riesgos que implica la extracción de dientes, entre los que se encuentran dolor, tumefacción, propagación de la infección, alveolos secos, senos descubiertos, pérdida de sensibilidad en los dientes, en los labios, la lengua y en los tejidos circundantes (parestesia) que puede durar por un periodo de tiempo indefinido. Entiendo que pudiera necesitar tratamiento adicional de un especialista u hospitalización si surgieran complicaciones durante o después del tratamiento y que yo seré responsable de su costo.

Comprendo que la odontología no es una ciencia exacta y por tanto la garantía de los resultados está sujeta a múltiples factores. Confío en el buen juicio y las decisiones del profesional durante el tratamiento, buscando siempre el mayor beneficio, razón por la cual si surgiese cualquier situación inesperada durante el tratamiento, autorizo al operador a realizar el procedimiento o maniobra que estime oportuna para la resolución de dicha situación.

Se me ha explicado que se me darán las indicaciones postoperatorias, medicación ambulatoria, según sea el caso, las cuales me comprometo a cumplir. Me comprometo a acudir a las citas y controles cuando el odontólogo así me lo indique, así como a mantener una higiene adecuada y cumplir con las instrucciones dadas. Estoy al tanto y me comprometo a cancelar las tarifas de la Institución; los costos están sujetos a posibles cambios sin previo aviso, pero notificado oportunamente.

Me siento libre, sin coacción ni manipulación, para decidir de acuerdo con mis valores e intereses y me declaro competente para tomar las decisiones que correspondan. En tal sentido DOY MI CONSENTIMIENTO AL FACULTATIVO A REALIZAR EL TRATAMIENTO PERTINENTE _____ o NO CONSIENTO _____, con el buen entendido que puedo retirar este consentimiento por escrito cuando así lo desee, sin represalia, ni penalidad alguna.

Nombre del paciente: _____ Edad: _____
Nombre del representante legal: _____ CI: _____
Parentesco: _____ Firma: _____
Nombre del profesional: _____ Firma: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____
Caracas, _____ de _____ de _____.



Anexo 2.



CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE LA PARTICIPACION EN UNA INVESTIGACION BIOMEDICA EN SERES HUMANOS EN EL POSTGRADO DE ENDODONCIA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UCV.

Yo, _____, de _____ edad, identificado con la cedula de identidad N° _____, domiciliado(a) en _____ como representante legal o familiar de _____, declaro lo siguiente:

He sido informado(a) por parte de el/la Odontólogo _____ (Cirujano Bucal del Centro Nacional de Ortodoncia) en forma clara y suficiente, el diagnóstico, la naturaleza de la enfermedad que padezco o padece mi representado y su evolución natural, objetivos del tratamiento propuesto, así como las alternativas de tratamiento (sobre lo cual pude participar), descripción de las consecuencias derivadas del tratamiento o intervención, beneficios, riesgos comunes del tratamiento (posibles complicaciones que se pueden desencadenar durante o después del mismo), riesgos personalizados (por presentar problemas de salud general que incidan sobre el tratamiento) por lo que debo acudir al centro sanitario y buscar al médico tratante en el caso de desencadenarse algún riesgo, adicionalmente debo presentar el informe médico correspondiente para anexarlo a la historia clínica y seré informado(a) en cada momento y a mi requerimiento de la evolución del proceso.

Me han explicado en forma clara y suficiente, sobre la participación en una investigación realizada por el Odontólogo Cesar Castillo del Postgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, en la que se recolectarán premolares extraídos por razones ortodónticas, la cual no afectará el protocolo de tratamiento indicado.

Acepto la realización de las radiografías, fotografías, y otros medios diagnósticos que sean necesarios para documentar la investigación; garantizándome la confidencialidad, el resguardo de mi identidad o la de mi representado y la utilización de dichos record sólo con fines académicos e investigativos.

- Diagnóstico(s) _____
Tratamiento(s) por realizar _____
Tratamientos alternativos _____
Riesgos y complicaciones inherentes al tratamiento _____
Beneficio esperado con el tratamiento por realizar _____
Riesgos y complicaciones en caso de no efectuarse el tratamiento _____

He recibido información respecto al plan de tratamiento y autorizo al odontólogo _____ a extraer los siguientes dientes _____. Comprendo los riesgos que implica la extracción de dientes, entre los que se encuentran dolor, tumefacción, propagación de la infección, alveolos secos, senos descubiertos, pérdida de sensibilidad en los dientes, en los labios, la lengua y en los tejidos circundantes (parestesia) que puede durar por un periodo de tiempo indefinido. Entiendo que pudiera necesitar tratamiento adicional de un especialista u hospitalización si surgieran complicaciones durante o después del tratamiento y que yo seré responsable de su costo.

Comprendo que la odontología no es una ciencia exacta y por tanto la garantía de los resultados está sujeta a múltiples factores. Confío en el buen juicio y las decisiones del profesional durante el tratamiento, buscando siempre el mayor beneficio, razón por la cual si surgiese cualquier situación inesperada durante el tratamiento, autorizo al operador a realizar el procedimiento o maniobra que estime oportuna para la resolución de dicha situación.

Se me ha explicado que se me darán las indicaciones postoperatorias, medicación ambulatoria, según sea el caso, las cuales me comprometo a cumplir. Me comprometo a acudir a las citas y controles cuando el odontólogo así me lo indique, así como a mantener una higiene adecuada y cumplir con las instrucciones dadas. Estoy al tanto y me comprometo a cancelar las tarifas de la Institución; los costos están sujetos a posibles cambios sin previo aviso, pero notificado oportunamente.

Me siento libre, sin coacción ni manipulación, para decidir de acuerdo con mis valores e intereses y me declaro competente para tomar las decisiones que correspondan. En tal sentido DOY MI CONSENTIMIENTO AL FACULTATIVO A REALIZAR EL TRATAMIENTO PERTINENTE _____ o NO CONSIENTO _____, con el buen entendido que puedo retirar este consentimiento por escrito cuando así lo desee, sin represalia, ni penalidad alguna.

Nombre del paciente: _____ Edad: _____
Nombre del representante legal: _____ CI: _____
Parentesco: _____ Firma: _____
Nombre del profesional: _____ Firma: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____
Caracas, _____ de _____ de _____.