

Efecto Antimicrobiano Agregado Trióxido Mineral y del Hidróxido In Vitro del Cemento de Calcio sobre el *Enterococcus Faecalis*

María J Ayala S, Alexandra Solórzano, Geraldine Tapias Servicio de Endodoncia. Universidad de Carabobo. Facultad de Odontología. Campus Universitario. Barbuja. Valencia. Estado Carabobo. Venezuela.
Correspondencia: mariajosefinaayala@hotmail.com

Resumen La mayor parte de la terapia endodóntica está encaminada a la eliminación de microorganismos existentes y a la prevención de la infección o reinfección del conducto y de los tejidos periapicales. La presencia de diferentes especies bacterianas resistentes en los canales radiculares, crea la necesidad de poner a prueba nuevos medicamentos con alto efecto antimicrobiano. La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano *In Vitro* del cemento agregado trióxido mineral (MTA) y del hidróxido de calcio, sobre el *Enterococcus faecalis*, para lo cual se desarrolló una investigación con propósito descriptivo-comparativo, con un diseño no experimental, de tipo longitudinal. La población fue de tipo censal conformada por una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC29212, la cual se sembró en placas con agar Mueller-Hinton y sobre las cuales se colocaron discos de papel de filtro impregnados con las diferentes sustancias de estudio. Los hallazgos más importantes fueron la ausencia de halos de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de las dos sustancias de estudio, se concluyó que tanto el MTA como el Hidróxido de Calcio no tienen ningún efecto antimicrobiano contra el *Enterococcus faecalis*.

PALABRAS CLAVE: Agregado Trióxido Mineral, Hidróxido de Calcio, *Enterococcus faecalis*.

Abstract *IN VITRO* ANTIMICROBIAL EFFECT OF CEMENT MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE (MTA) AND CALCIUM HYDROXIDE ON *E. FAECALIS*. Most endodontic therapy is aimed at the eradication of existing microorganisms and the prevention of infection or reinfection of the canal and periapical tissue. The presence of resistant bacterial species in root canals creates the need to test new drugs with high

antimicrobial effect. The purpose of present investigation was to determine the antimicrobial *in vitro* effect of mineral trioxide aggregate cement (MTA) and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*, with a descriptive-comparative experimental design. Tested sample was a strain of *Enterococcus faecalis* ATCC29212 which was plated on Mueller-Hinton and on which paper filter discs were placed embedded with the substances under study. Data was collected by direct observation. The most important finding was that no inhibition zones of bacterial growth were observed around the two substances under study. In conclusion, both MTA and Calcium Hydroxide have no antimicrobial effect against *Enterococcus faecalis*.

KEY WORDS: Mineral Trioxide Aggregate, Calcium Hydroxide, *Enterococcus faecalis*.

Introducción La mayor parte de la terapia endodóntica está encaminada, directa o indirectamente, a la eliminación de los microorganismos existentes y a la prevención de la infección o reinfección del conducto y de los tejidos periapicales. Sin embargo, la eliminación de estos microorganismos en el interior del conducto es un objetivo difícil de lograr en el tratamiento endodóntico y aún después del tratamiento, es posible encontrar en la profundidad de los túbulos dentinarios algún tipo de microorganismo. Debido a esto último, es esencial el uso de una buena medicación intraconducto. Medicamentos con un alto nivel antimicrobiano que permitan eliminar todos los gérmenes que puedan quedar dentro del sistema de conductos radiculares.¹ La presencia de diferentes especies bacterianas anaerobias y anaerobias facultativas dentro de los canales radiculares, resistentes a ambientes complejos, crea la necesidad de poner a prueba nuevos medicamentos con alto efecto antimicrobiano, incluso combinaciones de estos, para así lograr la desinfección total y definitiva del sistema de conductos radiculares durante la terapia endodóntica. Es importante recalcar que una de las principales causas de fracaso en un tratamiento endodóntico es la presencia de microorganismos, considerando que con los procedimientos de irrigación y preparación sólo se logra eliminar un porcentaje de éstos. Se debe tomar en cuenta el papel fundamental que juegan los medicamentos intraconductos entre citas, como medio para lograr una alta desinfección del sistema de conductos. En odontología, el *Enterococcus faecalis* está relacionado con infecciones endodónticas persistentes postratamiento, posee una alta variedad de factores de virulencia entre los que se incluyen la agregación, producción extracelular de superóxido, gelatinasa y citolisinas tóxicas,

capacidad para el intercambio de material genético y penetrar hacia los túbulos dentinarios.² El *E. faecalis*, es un micro-organismo anaerobio facultativo, Gram positivo y es un comensal normal adaptado ecológicamente a ambientes complejos de la cavidad oral y de los tractos vaginal y gastrointestinal.³ Los *Enterococcus* en su fisiología y estructura se describen como cocos gram positivos que se disponen en parejas y en cadenas cortas. Crecen en medios aerobios y anaerobios y en un amplio intervalo de temperatura (10-15 grados centígrados).

Aunque tienen necesidades vitamínicas complejas (Vitamina B, bases de los ácidos nucleicos y una fuente de carbono como la glucosa) el agar sangre de cordero permite su crecimiento. Tras 24 horas de incubación las colonias grandes pueden ser no hemolíticas o presentar hemolisis alfa y en algunos casos hemolisis beta. Pueden crecer en altas concentraciones de NaCl y de bilis, por lo que pueden ser identificadas en relación a otras especies de Gram positivos y catalasa negativos.⁴ Aunque no son productoras de catalasa, algunas especies de *Enterococcus* son productoras de pseudocatalasa cuando crecen en medio de cultivo que contienen sangre y pueden parecer débilmente positivos en la reacción de la catalasa.⁵ Los factores de virulencia del *E. faecalis* han sido motivo de estudio en los últimos años por la increíble resistencia que le confieren y por ser causa fundamental de importantes infecciones nasocomiales. En comparación con otros cocos Gram positivos, el *E. faecalis* posee una alta resistencia a todos los antimicrobianos usados en clínicas y hospitales, sobre todo a las cefalosporinas y los aminoglucósidos disponibles. En la región periapical, existe una estrecha relación parásito-huésped, debido a la presencia de bacterias que tienen la función de producir enzimas y endotoxinas, que a su vez producen la infección y de esa misma forma interfieren en la sensibilidad antibiótica, es por eso que persiste la misma. Es necesario el uso de un antimicrobiano efectivo que ejerza un papel coadyuvante en este proceso, y que favorezca la reparación residual, que sea inocuo e inofensivo para el diente, tejidos periapicales y que además actúe sobre las actividad enzimática de las bacterias.⁶ El hecho de no tener una variedad de medicamentos intraconducto que actúe efectivamente sobre bacterias resistentes como el *Enterococcus faecalis*, desfavorece el éxito de la terapia endodóntica ya que no solo es necesario la preparación biomecánica del conducto, sino además el uso de un antimicrobiano efectivo que no permita la recolonización de microorganismos que lleven a una infección post endodóntica. En consideración a lo antes expuesto, se considera el efecto antimicrobiano del Cemento Agregado Trióxido Mineral (MTA) e Hidróxido de Calcio sobre el *Enterococcus faecalis* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo y se comparó, a nivel descriptivo, la efectividad de ambos cementos. La siguiente

investigación se considera importante, por el hecho de representar un avance en el área de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, debido a que no se han hecho estudios al respecto. Con el paso de los años y los avances tecnológicos y bioquímicos en el área de la odontología y la endodoncia, se ha logrado crear una nueva generación de materiales dentales con mejores propiedades físicas, químicas y biológicas a fin de encontrar el material ideal que selle efectivamente el camino que comunica el sistema de conductos radiculares y la superficie externa del diente. Es por eso que aparece un nuevo material llamado Agregado Trióxido Mineral (MTA) que desde la década de los 90 (Siglo XX) se viene investigando. Consiste en un polvo de partículas hidrofílicas que endurece en presencia de humedad. La hidratación del polo forma un gel coloidal con un pH de 12.5 que solidifica y forma una estructura dura y resistente.⁷ Los materiales de obturación deben reducir el riesgo de infección bacteriana y un buen material de reparación debe sellar cualquier tipo de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y los tejidos vecinos de forma tridimensional, para evitar de esta forma, la migración bacteriana y el fracaso del tratamiento endodóntico. El Mineral Trióxido Agregado (MTA) permite crear una barrera estable a las bacterias y la filtración de los fluidos, éste es uno de los factores principales en el éxito clínico logrado por este material de reparación radicular. El Agregado Trióxido Mineral (MTA) es significativamente superior a otros materiales conocidos.⁸ Entre los usos del MTA se encuentran la terapia de pulpas vitales que estimula la formación de un puente de dentina adyacente a la pulpa. Debido a su habilidad selladora, biocompatibilidad, alcalinidad o posiblemente a otras propiedades asociadas;⁸ también se emplea en apicoformaciones en las que anteriormente se utilizaba hidróxido de calcio pero se requiere de mínimo 3 meses para lograr que se forme la barrera apical, lo que no sucede con el MTA que permite realizar el tratamiento en una sola sesión.⁹ Este material estimula la formación de tejido duro sin producir inflamación en el área adyacente al ápice de las raíces inmaduras.¹⁰ También es utilizado para reparaciones en perforaciones dentales. Estas ocurren durante el tratamiento endodóntico o durante la preparación de postes o simplemente como resultado de una reabsorción en tejidos radiculares. Se ha observado que el MTA permite la reparación del hueso y la eliminación de los síntomas clínicos propios de una perforación.¹¹ El Hidróxido de Calcio fue introducido por Hermann en 1920, como agente recubridor pulpar y luego en el tratamiento endodóntico.¹² El mecanismo de acción del hidróxido de calcio a través de su pH alcalino en el control de la actividad enzimática microbiana, posibilita su inactivación reversible e irreversible, dependiendo justamente del tiempo en que esté en contacto con los microorganismos, por lo tanto

para que sea eficaz es imprescindible que el hidróxido de calcio actúe por un tiempo prolongado. Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, ese tiempo debe ser de aproximadamente de 1 a 2 semanas. Mecanismo de acción antimicrobiano Tanto el cemento agregado trióxido mineral (MTA), como el hidróxido de calcio, son considerados materiales muy semejantes en cuanto a sus propiedades antimicrobianas; por un lado el MTA debe su efecto antimicrobiano a su alto pH y por otro lado el hidróxido de calcio permite la liberación de iones hidroxilo, que alteran la integridad de la membrana citoplasmática en el proceso de peroxidación lipídica de la bacteria.⁸ Se han realizado algunos estudios relacionados con la presente investigación, entre ellos se destacan los siguientes; Heredia¹³ estudió los aspectos microbiológicos de la periodontitis apical crónica y concluyó, en relación al *E. faecalis*, que es el microorganismo de mayor prevalencia en casos de periodontitis apical crónica persistente y no ha sido determinado su mecanismo de resistencia, al igual que el de otros patógenos asociados a estas lesiones donde se manejan diferentes hipótesis; por otra parte, ha sido comprobada la baja susceptibilidad del microorganismo a ciertas soluciones antisépticas y medicamentos utilizados durante la terapia endodóntica. Chr(10) Asimismo, García y Arashiro,¹⁴ determinaron el efecto antimicrobiano de tres cementos endodónticos en obturación retrógrada sobre tres especies bacterianas en un estudio In Vitro, donde lograron determinar que los tres cementos evaluados (Super EBA, Ketac Endo y MTA) poseen efecto antibacteriano variable sobre las tres especies bacterianas estudiadas (*E. faecalis*, *S. mutans* y *P. gingivalis*) dentro de las 24, 48, 168 horas.

Materiales y Métodos La presente investigación representa un enfoque cualitativo debido a la naturaleza de los resultados; de acuerdo al propósito, esta investigación fue descriptiva-comparativa.¹⁵ Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, durante el mes de mayo de 2012. La muestra seleccionada fue una cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, proveniente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, Estado Carabobo. La misma fue sembrada en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) y se llevó a estufa, durante 24 horas, a 37 grados centígrados, con el fin de garantizar su viabilidad. Luego, se realizó una tinción de Gram para poder confirmar la pureza de la misma (Figura 1). Una vez que se comprobó su pureza, se procedió a preparar una suspensión estandarizada de la cepa a una turbidez de 0.5 del patrón de Mac Farland, equivalente a 108 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Posteriormente, se tomó de esta suspensión un inóculo

estandarizado el cual se sembró por el método de superficie, con un hisopo, en placas de agar Mueller-Hinton y sobre estas se colocaron los discos de papel de filtro impregnados con las dos sustancias a estudiar; el cemento agregado trióxido mineral diluido al 0.7% y el hidróxido de calcio diluido al 98%, haciendo presión de estos sobre el agar. Adicionalmente, se colocó un disco impregnado con agua destilada estéril que actuó como control negativo y un disco de ampicilina que actuó como control positivo (Figura 2). Las placas fueron incubadas de 24 a 48 horas a 37 grados centígrados. Finalmente, se procedió a observar si se formaron los halos de inhibición alrededor de los diferentes discos de papel de filtro. La recolección de datos se hizo por medio de la observación directa. Para la medición de los halos de inhibición se utilizó una regla milimetrada y se midió a las 24 y 48 horas. Se anotaron las medidas y las observaciones respectivas para un registro de datos por medio de una guía de observación y se le calculó la validez por medio del juicio de tres expertos, un experto en metodología de la investigación y dos expertos de contenido.

Resultados **S**e observó que solo hubo presencia del halo de inhibición de crecimiento de *Enterococcus faecalis* en el grupo control positivo que estaba representado por un disco de ampicilina; a las 24 horas hubo ausencia del halo de inhibición de los grupos tratados con el hidróxido de calcio y el agregado trióxido mineral (MTA) (Figura 3). De igual forma ocurrió a las 48 horas, no se observaron halos de inhibición de crecimiento bacteriano en ambas sustancias de estudio. Es por esto que los resultados de la presente investigación demuestran que la cepa evaluada de *Enterococcus faecalis* es resistente a los dos cementos, hidróxido de calcio y MTA, utilizados en la muestra *In Vitro* y por consiguiente, no existe inhibición del crecimiento bacteriano del *E. faecalis* con ninguno de los cementos.

Discusión **E**n la mayoría de los estudios donde se evalúa actividad antimicrobiana, se utiliza la bacteria *E. faecalis* por su alta virulencia y la dificultad de ser removida de los conductos radiculares: la bacteria antes mencionada es sumamente agresiva, si es susceptible al medicamento, puede tener actividad bactericida contra cualquier otra cepa bacteriana; es por esto que para este tipo de investigación se usa el *E. faecalis*, el cual requiere altas concentraciones de medicamento y tiempo para ser removida de los conductos en infecciones endodónticas, debido a que es un comensal normal adaptado ecológicamente a ambientes complejos de la cavidad oral, así como también de los tractos

vaginal y gastrointestinal.³ La actividad antimicrobiana del cemento agregado trióxido mineral y el hidróxido de calcio no fue observada en este estudio, a pesar de que pueden llegar a alcanzar un pH de 12.5 lo cual, se supone, les otorga propiedades antimicrobianas.¹⁵ En este estudio, no se observó actividad antimicrobiana del cemento agregado trióxido mineral (MTA) sobre el *Enterococcus faecalis* ni a las 24 ni a las 48 horas, lo que contradice la investigación de García y Arashiro,¹³ que evaluó el efecto antimicrobiano de tres cementos selladores endodónticos (Super EBA, KetacEndo y MTA) sobre el *E. faecalis*, quienes encontraron que a las 24, 48 y 168 horas el Super EBA y MTA tuvieron más efecto antimicrobiano que el KetacEndo. Más adelante, en un estudio realizado por Miyagak C et al¹⁵ que evaluó la actividad antimicrobiana *In Vitro* de selladores endodónticos (MTA, Sealapex, Cemento de Portland), encontraron que el MTA no presentó actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis*, a las 24 horas. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en la presente investigación. Rodríguez-Varo, Pumarola J., Canalda C.¹⁶ por su parte, compararon la acción antimicrobiana *In Vitro* de diversas medicaciones administradas intraconducto sobre el *Enterococcus faecalis* y encontraron que el Calcipulpe®, un cemento utilizado en recubrimientos pulpares directos e indirectos a base de hidróxido de calcio que viene en una presentación de 20% combinado con otras sustancias, produjo inhibición bacteriana entre las 18 y 20 horas; a diferencia del presente estudio en el que no se observó ninguna actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis*. Sin embargo, esta diferencia puede deberse a la forma como fueron preparadas las sustancias; en esta investigación, se utilizó hidróxido de calcio diluido al 98%, mientras que dichos autores, prepararon el Calcipulpe® siguiendo las instrucciones del fabricante para realizar un Test de Difusión en Agar. Todo esto pudo influir significativamente en los resultados obtenidos. Al respecto, conviene decir que en la observación a las 24 horas se encontró presencia de mucha humedad en las placas que contenían las muestras de ambos cementos. Es importante destacar, lo anteriormente expuesto sobre todo en el caso del hidróxido de calcio, debido a que muchos autores han reportado que el medio de cultivo también influye en la solubilidad, liberación de iones y alcalinidad de éste compuesto químico, las cuales son condiciones esenciales para que se produzca el efecto antimicrobiano.¹⁵ Con los resultados obtenidos es indiscutible la afirmación de Heredia,¹² donde destaca que ha sido comprobada la baja susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* a ciertas soluciones antisépticas y medicamentos utilizados durante la terapia endodóntica. Cabe destacar que las concentraciones del hidróxido de calcio y el trióxido mineral agregado (MTA) utilizadas durante el estudio son las mismas que ofrece el fabricante, y es así como se usan en los procedimientos clínicos, razón

por la cual no son modificables.

Conclusiones **E**n el presente estudio se demostró que el trióxido mineral agregado y el hidróxido de calcio no poseen efecto antimicrobiano sobre el *Enterococcus faecalis* a las 24 y 48 horas de exposición en placas de agar. De igual forma, como los resultados en el presente estudio fueron iguales a las 24 y 48 horas, se concluye que el tiempo no tiene influencia en la actividad microbiana de los agentes evaluados.

Recomendaciones y limitaciones del estudio **S**e recomienda obtener halos de inhibición con la prueba de difusión en agar, que es la más comúnmente utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana *In Vitro*, porque permite realizar comparaciones entre los materiales muy influenciados por la difusión en el medio de cultivo. Por otro lado, se recomienda hacer los experimentos usando las sustancias preparadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante para tener una mayor confiabilidad en los resultados, por tratarse de la forma utilizada en la cavidad bucal. Finalmente, es recomendable realizar los experimentos por lo menos tres veces y con una antepueba, lo que aumentaría la posibilidad de resultados más confiables.

Figura 1

TINCION DE GRAM. *ENTEROCOCCUS FAECALIS*



Figura 2

**PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN
CON DISCOS DE AMPICILINA. HALO DE INHIBICIÓN
(CONTROL POSITIVO)**

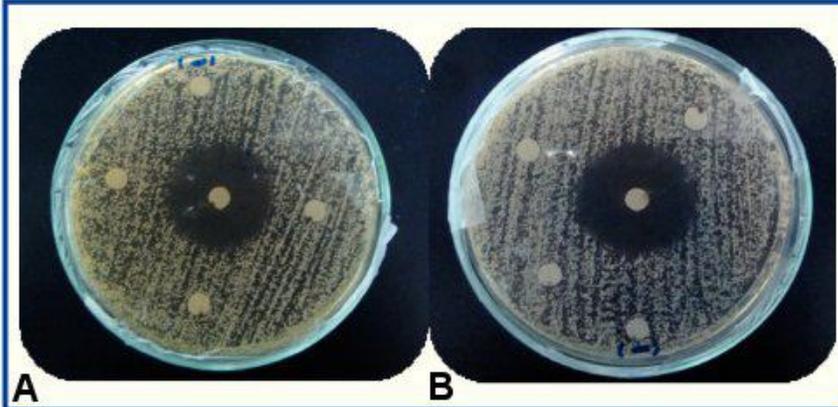
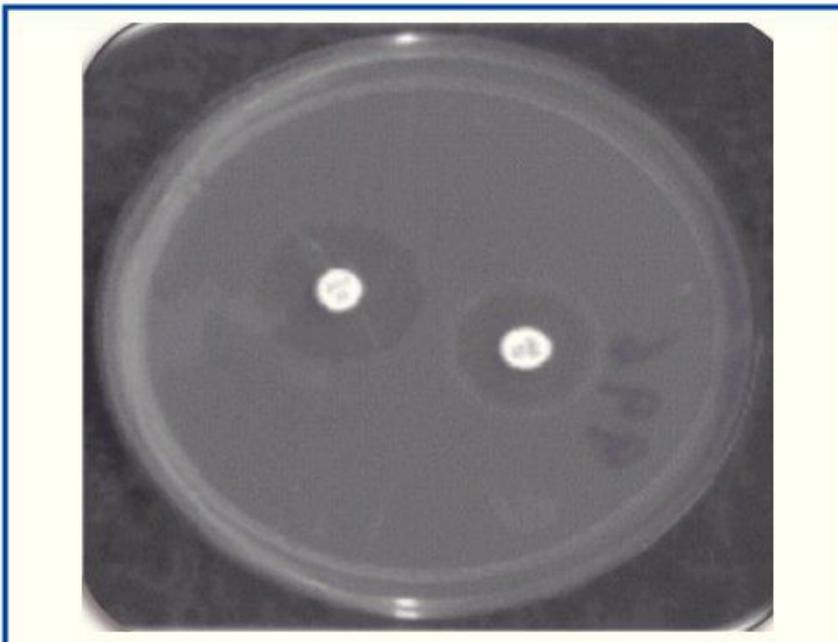


Figura 3

A: AUSENCIA DE HALO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA PLACA DE MTA. B: AUSENCIA DE HALO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA PLACA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO



Referencias

1. Ureña Liebana J. Microbiología Oral. Mac Graw Hill/Interamericana de España; 2002.
2. Negroni M. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía Práctica. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana; 2009.
3. Siqueira J F, Rocas I. Microbial causes of endodontic flare-ups. International Endodontic Journal. 2003;36:453-463.
4. Murray PR. Microbiología Médica. 6ª ed. Barcelona, España. Editorial Elsevier de España; 2009.
5. Forbes B. Diagnóstico Microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 2009.
6. Méndez Romero Y, Couto M. Propiedad Antimicrobiana del Hidróxido de Calcio. ODOUS Científica.
7. Torabinejad M, Pairokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature Review- Part I: Chemical, Physical and antibacterial Properties. Endo J. 2010;36:16-27.
8. Bellet, Guinot, Arregui. Aplicaciones Clínicas del MTA en Odontopediatría. Dendum (Barcelona, España) 2006;6:96-102.
9. Miñaga Gomez M. el Agregado Trióxido Mineral en Endodoncia. RCOE (España). 2002;7:283-289.
10. Holland, R. M Otoboni et al. Mineral Trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J. Endod (Sao Paulo, Brazil). 2001;27:281- 284.
11. Silva-Herzog D, Andrade L, Lainfiesta J. Comparación del hidróxido de calcio con o m medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos. Estudio in vitro. Revista ADM 2003;LX:14-18.
12. Heredia Aguilar T; Aspectos Microbiológicos de la Periodontitis Apical Crónica Persistente. [Monografía en Internet]. Caracas. Carlos Bóveda, Endodoncia. 2004 [accesado el 25 de Enero de 2012]. Disponible en: http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_41.htm
13. García H; Arashiro C. Efecto antibacteriano de 3 cementos endo-

dónticos usados en obturación retrograda sobre tres especies bacterianas. Estudio *In Vitro*. Revista Kiru (Perú) 2008;5:105-112.

14. Hernández Sampieri R, Fernández C, Baptista L. Metodología de la Investigación. México, DF. Mac Graw Hill/Interamericana. 2006.

15. Miyagak D, Oliveira E, Colombo C, Chavasco J, Labegalline G. In vitro Evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz Oral Res. 2006;20:303-306.

16. Rodríguez L, Pumarola J, Canalda C. Acción Antimicrobiana In Vitro de distintas medicaciones sobre *E. faecalis* y *A. israelii*. Endodoncia. 2009;27:7-12.