

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**ESTUDIO DE FILTRACION BACTERIANA EN TRES TECNICAS DE
OBTURACION DIFERENTES INOCULANDO *Enterococcus faecalis***

**No. DE REGISTRO:
2013-19**

Tesis que como requisito para obtener el grado de Especialista en Endodoncia
presenta:

CD. FELIX INZUNZA BRISA GUADALUPE

Director de Tesis:

DR. JOSE GEOVANNI ROMERO QUINTANA

Codirector:

DR. ROSALÍO RAMOS PAYAN

Asesor (es):

DCM. MARIA DE LOURDES VERDUGO BARRAZA

Culiacán de Rosales, Sinaloa. Diciembre de 2013

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia.

A mi madre Juana Inzunza por su ejemplo de mujer y ser mi guía en la vida, por su esfuerzo y constante apoyo y por esa fortaleza interna que me ha sabido transmitir.

A mi padre Doroteo Almeida por sus consejos, apoyo y cariño constante cada día de mi vida y por ayudarme a formarme como profesionista.

A mi hermana Rocío Félix por ser una de mis mejores amigas, por su cariño, confianza y por impulsarme en cada paso que he dado.

A Héctor Emmanuel Acosta por ser mi pareja, mi mejor amigo, padre de mi hija y el amor de mi vida, por su apoyo diario y muestras de cariño, y por el esfuerzo para que la realización de esto fuera posible.

A Emma Sofía Acosta, mi hija, por convertirse en el motivo que me impulsó para terminar esta importante etapa en mi vida, y la razón de mi esfuerzo diario para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

La lista de las personas a quien tengo que agradecer por la realización de esta tesis es muy larga. Agradezco al Dr. José Geovanni Romero, por su apoyo constante, por creerme capaz, por tener una enorme paciencia para enseñarme un panorama totalmente diferente al que acostumbraba y ayudarme cada vez que lo necesite incondicionalmente.

A Mariana Melissa Avendaño y Erik René Lizárraga mis compañeros en el laboratorio, por ser mis guías y dedicarme su tiempo para enseñarme un poco de todo lo que saben, y por tenerme una enorme paciencia y ayudarme a que esto sea posible.

A cada uno de mis maestros la Dra. Vania Serrano, Dr. Alfredo Ayala, Dra. Verena Morales, Dra. Yolanda Castro, Dra. Lourdes Verdugo, Dr. Omar cazares, Dr. Manuel Gómez Rúelas, Dra. Ilsa Inzunza, por sus enseñanzas, apoyo, tolerancia, profesionalismo y por convertir esta estancia como un segundo hogar para mí.

A cada uno de mis compañeros Héctor Acosta, Dulce Hernández, Adelina Rocha, Rocío Beltrán, Gabriel García, Fernando Aristegui, Alejandro Ceceña y Diego Pantoja por acompañarme y convertirse en mi familia estos dos años y superar conmigo lágrimas, problemas, cansancio y estrés con muestras de cariño y apoyo día a día. Compañeros, amigos, hermanos, gracias por ayudarme a superar esta prueba.

A la Dra. Margarita Castro por siempre estar dispuesta a ayudar de una manera desinteresada.

A Carolina López por ser la mejor de las amigas y siempre estar presente en mi vida.

RESUMEN

Introducción: La obturación del conducto radicular corresponde a la fase final del tratamiento endodóntico y manifiesta la calidad del mismo. En la actualidad se han aprobado varias técnicas de obturación que han venido a mejorar el sellado hermético del conducto radicular; sin embargo como estableció Kakehashi (1965), las bacterias son el principal factor causal de la enfermedad pulpar y perirradicular, aun cuando la endodoncia se ha realizado estos pueden filtrar y ocasionar problemas. La bacteria altamente encontrada en fracasos endodónticos es el *Enterococcus faecalis*. **Objetivo:** Determinar cuál es la mejor técnica de obturación endodóntica en cuanto a filtración de *Enterococcus faecalis*. **Materiales y métodos:** se fabricó un dispositivo a prueba de fugas en donde se colocó el órgano dental obturado y se inoculó *Enterococcus faecalis*, se observó el tiempo de filtración del mismo y se hicieron pruebas moleculares para su identificación. **Resultados:** Todos los dispositivos filtraron manifestando una turbidez en la parte inferior del mismo. Los controles se mantuvieron libres de bacterias y sin permitir filtraciones. Los días de filtración tuvieron variaciones que bajo el procesamiento de la prueba estadística T de Student muestra una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre grupo de condensación lateral y los grupos de condensación vertical y condensación con guttacondensador. Los resultados se corroboraron con prueba de ANOVA con corrección de Tukey, mostrando la misma relación ($p < 0.001$). **Conclusiones:** las técnicas vertical y con guttacondensador retardan más el paso del *Enterococcus faecalis* sin diferencia estadística entre ellas.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, filtración, técnicas de obturación.

ABSTRACT

Introduction: The root canal filling corresponds to the final phase of endodontic treatment and manifests its quality. At present, several techniques have been approved that improve the sealing of the root canal, but as established by Kakehashi (1965), bacteria are the main factor of pulpal and periradicular disease, even when the endodontic has been made, these can filter and cause problems. The bacterium mainly found in highly endodontic failures is *Enterococcus faecalis*,

Objective: To determine the best endodontic obturation technique in terms of *Enterococcus faecalis* filtration. **Materials and methods:** a leak-proof device was manufactured, where the dental body was placed and sealed and *Enterococcus faecalis* were inoculated, we observed the filtration time and afterwards molecular identification tests were made. **Results:** All devices leaked thereof showing turbidity on the bottom. The controls remained free of bacteria without allowing leaks. The filtration days were different and the T student test shows a significant difference ($p < 0.001$) between lateral condensation group and the other two. These results were confirmed using ANOVA with Tukey correction, revealing the same relation ($p < 0.001$). **Conclusion:** The vertical techniques and guttacondensor condensation best delay filtration of *Enterococcus faecalis*, with no statistical difference between them.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, filtration, sealing techniques.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	5
	2.1. TRATAMIENTO DE CONDUCTOS	5
	2.2. OBTURACIÓN	5
	2.2.1. MATERIAL DE OBTURACIÓN.....	6
	2.2.2. TÉCNICAS DE OBTURACIÓN.....	8
	2.3. MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA.....	12
	2.3.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	15
	2.3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	17
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV.	JUSTIFICACIÓN	21
V.	OBJETIVOS.....	22
	5.1. OBJETIVO GENERAL	22
	5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
	6.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO	23
	6.2. MUESTRA DE ESTUDIO.....	23
	6.2.1. Criterios de inclusión	23
	6.2.2. Criterios de exclusión	24

6.2.3. Criterios de eliminación	24
6.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	24
6.4. LUGAR DE REALIZACIÓN	25
6.5. PROCEDIMIENTO	25
6.5.1. Almacenamiento	25
6.5.2. Preparación de las piezas dentarias	25
6.5.3. Grupos de estudio	26
6.5.4. Técnicas de Obturación	27
6.5.4.1. Técnica de condensación lateral	27
6.5.4.2. Técnica de condensación vertical	27
6.5.4.3. Técnica de condensación con guttacondensor	28
6.5.5. Ensamblado del dispositivo de filtración	28
6.5.6. Ensayos de filtración	29
6.5.6.1. Controles	30
6.5.7. Diagnóstico molecular	30
6.5.7.1. Extracción de ADN genómico bacteriano	30
6.5.7.2. Identificación de <i>E. faecalis</i>	31
6.5.8. Procesamiento estadístico	32
VII. RESULTADOS	33
VIII. DISCUSIÓN	40

IX.	CONCLUSIONES.....	44
X.	RECOMENDACIONES.....	45
XI.	BIBLIOGRAFÍA	46
	ANEXOS.....	54
1.	Turbidez estándar	54
1.1.	Preparación de la turbidez estándar de McFarland.....	54
1.2.	Método de conteo en placa para probar la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland.....	55
1.3.	Resultados de la interpretación del conteo por placa.....	61

I. INTRODUCCIÓN

Al paso del tiempo, la humanidad ha tratado de quitar los dolores dentales de los dientes afectados con caries profundas o por algún traumatismo, mediante la extirpación del paquete vasculo nervioso, el cual se encuentra en el conducto principal y en la amplia variedad del sistema de conductos radiculares, y lo logra utilizando medios físicos y mecánicos, tales como: instrumentos y diversas sustancias de irrigación que alcanzan los lugares inaccesibles de la instrumentación. También ha tenido que buscar los medios adecuados para tratar de cerrar el espacio dejado por la extirpación de dicho paquete, a todo este proceso se le ha denominado Endodoncia. El correcto llenado de este espacio, o la obturación radicular propiamente conocida, complementa lo que representa el objetivo de la triada endodóntica del conducto radicular (apertura coronaria, saneamiento y sellado endodóntico). Esto refuerza el concepto sobre la importancia de eliminar los espacios vacíos en el interior del diente (1).

El sistema de conductos radiculares es complejo y alberga numerosas irregularidades, que incluye aletas, deltas, istmos y canales accesorios y laterales. La desinfección y obturación incompleta del sistema de conductos radiculares en última instancia, puede conducir a un fracaso endodóntico. La obturación tridimensional de este complejo sistema es imprescindible después de la limpieza adecuada y la formación para lograr un resultado predecible. El material de

obtención ideal debe ser biocompatible, estable y adaptable a las irregularidades del conducto radicular (2).

La obturación del conducto radicular corresponde a la fase final del tratamiento endodóntico y manifiesta la calidad del mismo por medio del simple aspecto radiográfico que aunque de carácter muy limitado concluye el único medio disponible en el momento. La humanidad ha utilizado desde láminas de oro, puntas de plata, bronce y un sin número de materiales, siendo la gutapercha la más utilizada en las diferentes técnicas de obturación del sistema de conductos (1).

Nguyen citado por Gound indicó que un objetivo importante al obturar los conductos radiculares es maximizar el volumen de material de núcleo lleno en el conducto y minimizar el volumen del sellador del conducto radicular (3).

Se ha ideado un sin número de técnicas de obturación para tratar de lograr un sellado hermético dentro del conducto radicular, como la técnica de condensación lateral, técnica de condensación vertical, técnica de obturación con guttacondensador, técnica thermafill, entre otras. Pero se ha comprobado que la filtración bacteriana se ha debido a micro filtraciones que siempre encontramos en las restauraciones protésicas indicadas después del tratamiento endodóntico (4).

Es justo decir que la obturación con la utilización de las técnicas más comunes son el eslabón más débil en la terapia endodóntica. Torabinajed citado por Shipper demostró que cuando los conductos obturados fueron desafiados por

bacterias, el 50% permite la penetración a través de toda la longitud del canal dentro de los 30 días (5).

Davalow citado por Jacobson menciona que la preocupación se debe dar a la calidad del sellado coronal. Si una restauración temporal está sujeta a filtración coronal, a continuación, cualquier técnica de obturación está expuesta a la contaminación (6).

Tradicionalmente, el tratamiento del conducto radicular o endodoncia se realiza en varias visitas, con la medicación entre la preparación del conducto radicular y la obturación, el cual tiene como objetivo principal reducir o eliminar los microorganismos y sus productos derivados del sistema de conductos radiculares antes de la obturación. Múltiples visitas de tratamiento del conducto radicular es bien aceptado como un tratamiento seguro y común, sin embargo, en los últimos años, existe una preocupación creciente acerca de las capacidades de resistencia de ciertas especies microbianas (7).

El microorganismo *Enterococcus faecalis* es la especie bacteriana más común cultivada en conductos con fracaso de tratamientos, por lo que su presencia se ha considerado como un factor de riesgo para el éxito de la endodoncia. Sin embargo, es poco observado en las infecciones primarias, solo en casos de tratamientos de varias citas o cuando el diente permaneció abierto para provocar un drenaje. Por estas razones se ha decidido la inoculación de esta bacteria que tanto amenaza nuestro propósito al obturar (8).

Se realizarán pruebas de PCR para el reconocimiento de dicha bacteria posterior a que se presente la filtración en cada una de las técnicas de obturación presentadas. Así se reconocerá cual es la técnica de obturación que es más fácilmente filtrable para el *Enterococcus faecalis*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. TRATAMIENTO DE CONDUCTOS

En 1924, Hanton indico: “quizá no exista una operación técnica en odontología o cirugía que dependa tanto de la aplicación consciente de ideales elevados como el relleno del conducto pulpar” esto más que nada se debía a la falta de desarrollo en las técnicas de preparación y obturación en los conductos radiculares (8).

De acuerdo con los principios básicos que orientan en la endodoncia actual, todas las fases del tratamiento de conductos radicular deben ser encaradas con la misma atención. Una intervención perfecta será aquella que iniciase con un correcto diagnóstico y una obturación lo más hermética posible.

El éxito final del tratamiento de conductos está condicionado a este paso y de nada servirán los cuidados de antisepsia, de ejecución de una técnica traumática o de la preparación biomecánica, si la obturación esta defectuosa (9).

2.2. OBTURACIÓN

Antes de 1800, el único material empleado para rellenar el conducto radicular, cuando se hacía, era el oro. Las obturaciones posteriores con diversos metales, oxiclورو de Zinc, parafina y amalgama, proporcionaron grandes variables de éxito y satisfacción.

En 1847, Hill desarrolló el primer material de relleno del conducto radicular a base de gutapercha y carbonatos de calcio blanqueados y cuarzo, fue patentado en 1848 e introducido en la práctica odontológica.

En 1867 Bowman indicó el primer relleno de un órgano dental con gutapercha que hoy en día es utilizado en ciertas modificaciones claro esta y con cementos agregados que permiten un mejor sellado (8).

La presencia de lagunas interfaces marginales entre los materiales y la dentina radicular son sitios de micro filtración posible y el paso de bacterias y sus toxinas, por eso también es necesario tomar en cuenta el cemento sellador a utilizar que le va a permitir a la gutapercha y a la dentina una mejor unión sin que exista la presencia de espacios sin rellenar (10).

Los selladores de uso habitual en la endodoncia se pueden agrupar en 4 categorías: selladores con base de resina y selladores con base de ionómero de vidrio, cada uno de ellos representa ciertas ventajas y desventajas y es considerado para cada caso (11).

2.2.1. MATERIAL DE OBTURACIÓN

Cuando hablamos de obturación nos referimos a rellenar el conducto en toda su extensión con un material inerte, que selle herméticamente y en forma permanente, sin intervenir en la reparación, que estimule la cicatrización.

Hay varios requerimientos que debe cumplir un material de obturación tal como: fácil manipulación, capacidad de sellar el conducto apical en forma lateral, estabilidad dimensional, ser impermeable, bacteriostático, no debe ser irritante, estéril, y de fácil remoción de ser necesario, etc. (9).

También existen otras consideraciones que debemos tomar en cuenta para obtener una obturación correcta como lo son: ensanchamiento del conducto radicular con tamaño óptimo, conducto radicular seco, que no exista fistula y que no haya mal olor (4).

La gutapercha (GP) es el material de obturación más utilizado. Sus propiedades químicas y físicas satisfacen los requisitos de un material de obturación ideal y hacen posible su uso con variables técnicas de obturación (2).

Shipper citado por Wedding menciona que hay otros materiales de obturación aparte de la gutapercha que permite un mejor resultado. Comparando la filtración bacteriana de gutapercha y resilon, se encontró que tenían una media de fuga de 73% - 93% y 7% - 13% respectivamente. Aunque Wedding sugiere que aunque los resultados obtenidos por Shipper y por el mismo favorecen al resilon, hay pocos estudios realizados entre estos por lo cual menciona que el uso de gutapercha sigue siendo el más efectuado para la obturación (12).

El objetivo de la obturación es impedir la percolación y micro filtración del exudado periapical al espacio del conducto, no permitiendo la reinfección y creando un medio biológico aceptable para que se produzca el proceso de curación tisular (9).

Schilder en 1967 afirmó que la obturación debe rellenar de forma tridimensional el conducto radicular. Al no rellenar los conductos en tres dimensiones se formarán espacios tanto apical como coronal o internamente dentro de la masa de gutapercha, produciendo filtración, que favorecerá el crecimiento bacteriano o la reinfección (13).

Un sellado hermético no se puede obtener sin el uso de un sellador, debido a que la gutapercha no se adhiere espontáneamente a las paredes de la dentina.

Lee también sugiere los conos de gutapercha como el material sólido utilizado con mayor frecuencia para obturar los conductos radiculares (1).

Estos están estandarizados a la forma cónica de instrumentos ya estandarizados, mientras que los conos convencionales accesorios en general tienen una punta que es más pequeña que los instrumentos estandarizados y con un cuerpo que es más amplio. Están disponibles en solo dos tipos de conos: tamaños convencionales (Extra-Fine, Medium-Fine, Fine, Fine-Medium y Medium) o el sistema de Luks tamaños A, B, C o D (14).

2.2.2. TÉCNICAS DE OBTURACIÓN

Hoy en día son varias las técnicas de obturación que el clínico puede realizar, estas pueden variar según las condiciones del órgano dental tratado, el estado de la instrumentación o según se la técnica con la que mejor se identifique (13).

La técnica de compactación lateral en frío es la técnica más utilizada por su eficacia comprobada, sencillez, control del límite apical de la obturación y el uso de un instrumental simple. Esta técnica ha sido utilizada por mucho tiempo y ha sido patrón con el que se comparan otras técnicas (1).

Esta técnica parece haber sido inicialmente propuesta por Callahan en 1914. El término condensación lateral se refiere a la colocación sucesiva de conos auxiliares lateralmente a un cono principal bien adaptado y cementado en el conducto. La masa final de puntas se corta a nivel del orificio coronario del conducto radicular con un instrumento caliente, efectuándose la condensación vertical final, con un condensador de menor calibre (9).

La condensación lateral (LC) ha demostrado ser una técnica eficaz clínicamente y se enseña en la mayoría de las escuelas de odontología. Allison citado por Smith informó que la calidad del sellado apical, fue significativamente superior cuando los espaciadores penetran a 1.0 mm dentro de la terminación de la preparación apical. Sin embargo, Brayton citado por Smith informó que esta técnica produjo numerosas irregularidades y carecía de una masa homogénea de GP. Los huecos creados por las crucetas y los conos accesorios pueden permanecer vacíos o están llenos solo con el sellador (2).

En los pequeños conductos curvos los espaciadores de Níquel Titanio pueden penetrar más que los de acero inoxidable y permiten realizar mejor la técnica de condensación lateral en estos casos (14).

Schilder (1967) difundió el uso de gutapercha caliente en el conducto y compactada en sentido vertical, de esta manera el sellado tridimensional mejora y se eliminan posibles vías de micro filtración (1).

Compactación caliente vertical (CV), como se describe por Schilder ofrece una técnica que utiliza el control de la longitud apical mientras que proporciona las ventajas tridimensionales de las técnicas termo plastificadas. Con este proceso los conductos accesorios son rutinariamente llenados en los tercios cervical y medio, así como en los detalles apicales. Idealmente, esta técnica requiere solo una película de micro sellador que rodea la mayor parte de gutapercha homogénea.

Una ventaja pretendida de la técnica de condensación vertical es la capacidad de ablandar la gutapercha por lo que se puede moldear a las diferentes configuraciones en el sistema de conductos radiculares (15).

La técnica CV puede ser muy lenta y resultar en fracturas verticales de raíz si se utilizan fuerzas excesivas. Otra desventaja de esta técnica es la necesidad de una llama para calentar el transportador de calor antes del reblandecimiento técnico de la GP en el conducto y el calentamiento de un instrumento de esta manera es inconsistente y puede alcanzar una temperatura de 380°C en el momento de la inserción y este proceso puede conducir a un accidente de procedimiento (2).

Dagher menciona la influencia del grado de ampliación apical en el sellado apical de condensación vertical durante un periodo de 24 semanas (16).

Bowman menciona la necesidad de la aplicación de una ligera fuerza durante la compactación de la técnica vertical para evitar el paso de burbujas de aire que nos puedan resultar en espacios libre de material de obturación (15).

La onda continua de la técnica de condensación, desarrollado por Buchanan permite la combinación de técnicas híbridas entre técnicas laterales en frío y verticales calidad ya que permiten un obturación de calidad (17).

Las técnicas de gutapercha termoplastificadas consiguen un mejor sellado de las irregularidades del conducto. En el año de 1879, MacSpadden introdujo una técnica de compactación termoplastificada. En esta técnica un condensador giratorio crea calor por fricción en el interior del conducto radicular y plastifica un cono de gutapercha, que es forzada lateral y apicalmente a obturar el espacio del conducto radicular.

El condensador tiene una apariencia similar a una Hedstrom invertida, se coloca en un contrángulo y se introduce en el conducto radicular en la medida de lo posible apicalmente y se hace girar a la velocidad mínima recomendada de 8,000 rpm. Presión apical suave es aplicada al condensador hasta que la gutapercha queda convertida en plástico. En esta longitud, el condensador se retira lentamente mientras que la rotación debe mantenerse (18).

Cuando la gutapercha es sometida a temperaturas altas alcanza una consistencia que muchas veces permite el desbordamiento del material hacia afuera de los tejidos perirradiculares (14).

Tagger propuso una técnica híbrida mediante la cual se podían utilizar la técnica lateral convencional y la técnica de compactación termoplastificada con condensador. Esto permitía evitar errores de obturación ya que la técnica lateral convencional proporciona un sellado apical y el adicionar la compactación con condensador permitía un calentamiento de la gutapercha y la obtención de una mejor calidad de sellado (18).

Un factor importante evaluado por Dagher en su estudio es la experiencia que tiene el operador con las técnicas de instrumentación y al mismo tiempo las técnicas de obturación, ya que esto permitirá mejor calidad de sellado del conducto con cada técnica utilizada (19).

Chu menciona en el reporte de su estudio la importancia de reconocer que cualquier técnica de obturación resulta deficiente si la posterior reparación protésica no se realiza o se realiza inadecuadamente (20), los conos de gutapercha no evitan el paso de las bacterias solo lo retardan, un conducto sin conos de gutapercha permite la filtración de bacterias por triplicado (21).

2.3. MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

Kakehashi en 1865 estableció que las bacterias son el principal factor causal en el desarrollo de la inflamación periapical.

Lea menciona que la técnica de condensación lateral deja huecos entre los conos que a menudo no se completan con el sellador y puede proporcionar un lugar para que las bacterias prosperen (17).

En los últimos años, el conocimiento del papel de los microorganismos en las infecciones endodónticas ha alcanzado un alto nivel de sofisticación en los tratamientos. El desarrollo de técnicas de cultivo anaerobias así como el conocimiento del papel de pared de la célula bacteriana y sus componentes, Tales como endotoxina y el ácido lipoteicoico, en procesos inflamatorios se han sumado a nuestra comprensión, ayudándonos a tener en cuenta ciertos avances para el éxito endodóntico (22).

Según Sundqvist 1983 una cuidadosa obturación es esencial para evitar la reinfección del conducto radicular pero incluso después de una limpieza a fondo, la formación y el riego con desinfectantes, la eliminación total de las bacterias es difícil de lograr en todos los casos (23, 24).

Existen varias técnicas para observar la microfiltración, años atrás se realizaban estas utilizando tintes y observando el paso de estos, claro está que el paso de este material no representa un acto biológico y por eso fue descartado para iniciarse las pruebas con bacterias (23).

La mayoría de los métodos utilizados en la evaluación de la fuga, aparte de los métodos de penetración de tintes mencionado por Spangberg, como la prueba electroquímica de fuga, y la técnica de filtración de fluidos, muestran grandes limitaciones.

Sagsen menciona una técnica de filtración de fluido computarizado, alega que esta técnica tiene algunas ventajas adicionales, tales como ordenador de control de presión digital, arreglo de aire, y sigue el movimiento de burbujas de aire por ondas laser (11).

En la actualidad el uso de estos tintes y otros sistemas de filtración han sido descartados ya que notaron que existía gran diferencia entre el comportamiento de estos y el comportamiento de las bacterias que es lo que ocurre realmente en el conducto, promoviendo en la utilización de dispositivos a pruebas de fugas y el uso de algunas cepas bacterianas (25).

Las bacterias que soporten el tratamiento y son detectadas en el post tratamiento, deben resistir los procedimientos de desinfección intra-conducto, y adaptarse al entorno cambiado drásticamente.

Existen varias estrategias que pueden ayudar a las bacterias para resistir el tratamiento: pueden adherirse a las paredes del conducto radicular, se acumulan y forman comunidades organizado en biopelículas, que pueden ser importantes para la resistencia bacteriana a los procedimientos antimicrobianos. Las bacterias ubicadas en ramificaciones, istmos, y otras irregularidades que pueden escapar de los efectos de los instrumentos (debido a limitaciones físicas) e irrigantes (por falta de tiempo) utilizados durante la preparación biomecánica. La capacidad de algunas bacterias para penetrar en los túbulos dentinarios profundamente puede permitir que se escapen de la acción de los instrumentos y materiales utilizados durante el tratamiento (26).

2.3.1. *Enterococcus faecalis*

Estudios de cultivo han demostrado que la microbiota de infecciones persistentes intraradiculares o secundarios asociados con el fracaso del tratamiento endodóntico, a diferencia de las infecciones primarias, es generalmente compuesto de sólo una o dos especies bacterianas. Bacterias Gram-positivas facultativas, particularmente *Enterococcus faecalis*, son los predominantes (27–30).

Las soluciones de irrigación pueden presentar actividad y lograr la muerte de una gran cantidad de bacterias presentes en el sistema de conductos radicular pero no erradicar la *E. faecalis* (31).

Enterococcus faecalis es el organismo que se asocia con inflamación apical persistente en situaciones donde los órganos dentales ya han sido tratados. Se ha demostrado que produce una infección densa de los túbulos dentinarios, alcanzando fácilmente 300-400 μm (32,33).

Molande dice que la penetración de rellenos del conducto radicular por *Enterococcus faecalis* es muy frecuente, esto se debe a la propiedad de esta bacteria de sobrevivir en lugares inhóspitos (25).

Enterococcus faecalis es una bacteria de formación, facultativa-fermentativa, son cocos Gram-positivos. Las *E. faecalis* son ovoides y de 0,5 a 1 μm de diámetro. Se presentan individualmente, en parejas o en cadenas cortas, y con frecuencia son

alargadas en la dirección de la cadena. La mayoría de las cepas son no hemolíticas y no móviles. El contenido del ADN varía desde 37 a 40% en moles (34 – 36).

El hidróxido de calcio [Ca (OH)₂] es uno de los medicamentos intra-conductos más utilizados para la eliminación de los microorganismos restantes a la preparación biomecánica, siendo el *E. Faecalis* resistente a dicho medicamento (20, 37, 38).

Las células, las bacterias del biofilm son hasta 1000 veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos, y muchos antibióticos *E. faecallis* es caracterizado por su capacidad para la formación de biofilms (39, 36).

Rathnayake menciona en su artículo donde estudió a *E. faecalis* que es una de las bacterias que presenta resistencia a algunos antibióticos asociada a una presencia de genes de resistencia, esto les permite hacer frente a antibióticos como eritromicina y ampicilina entre otros, siendo estos los más comúnmente utilizados (40).

La Vacomicina es un medicamento comúnmente utilizado en pacientes con alergias a las penicilinas y esta bacteria también resulta ser altamente resistente, lo que nos deja con menos armas para defendernos (41).

Fedele realizó un estudio donde demuestra que la presencia del transposón conjugativo Tn916, que contiene el gen de resistencia a la tetraciclina (tet-M) permitió que una cepa de *E. faecalis* sobreviva al riego con una solución que

contiene una concentración extremadamente alta de tetraciclina en un modelo de conducto radicular, lo que indica resistencia también a este antibiótico (42).

Incluso la infección por *E. faecalis* de los tejidos tumorales orales sugiere una posible asociación entre la infección por *E. faecalis* y la carcinogénesis oral, lo que nos indica el alcance del daño que la persistencia de esta bacteria nos puede causar (43).

Aplicando técnicas moleculares de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en órganos dentales con fallo de la terapia endodóntica se confirmó que *E. Faecalis* tiene una alta prevalencia del 77% de los casos (27).

Molander sugiere que existe un peor pronóstico en los retratamientos, indica que esto puede ser, al menos en parte, debido a las diferencias en la composición de la flora en comparación con los casos primarios ya que la resistencia que presentan las bacterias que en estos casos se presentan es mucho mayor, coincidiendo con otros autores (44 - 47).

2.3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ensayos moleculares rápidos, precisos y muy sensibles permiten ahora convertir los resultados de identificación microbiana en cuestión de minutos o unas pocas horas.

PCR y otras técnicas de biología molecular mantienen la esperanza de hacer que el conocimiento de los procesos infecciosos de endodoncia sea más preciso.

Además, los métodos moleculares tienen el potencial de hacer un diagnóstico más rápido y con evidencia basada en tratamiento antimicrobiano en realidad (27).

El método de amplificación de ADN que es conocido como método de PCR permite la identificación indiscutible de cada bacteria, por eso es utilizado actualmente en los estudios de filtración bacteriana para su identificación, así como ha permitido mantener una clasificación taxonómica de las bacterias encontradas en tratamientos de conductos fallidos (45 - 49).

Zoletti publica en su estudio que la PCR se tiene que seguir con un procedimiento que cuenta con pasos individuales que proporciona el que obtengamos resultados reales (50).

La separación por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% de las ampliaciones de las PCR permite que reconozcamos los pares de bases presentes en el ADN que pertenece a cierta bacteria. Sugiriendo para la identificación de *E. faecalis* una presencia de 1 banda (34, 51).

En el año 2003, fue llevado a cabo por Pinheiro y cols. un estudio enfocado a la identificación de la microbiota del sistema de conductos radiculares de dientes tratados endodónticamente con periodontitis apical crónica persistente. Para este estudio fueron analizados 60 casos en los cuales se evidencio crecimiento microbiano en 51 de las muestras. Se demostró la presencia de infección producida por una sola especie en 28 casos, ocho casos presentaron dos especies y 15 casos presentaron infección polimicrobiana (3 especies o más). Este estudio involucro dientes con buena y pobre calidad de obturación

endodóntica, mostrando una asociación significativa entre los conductos obturados deficientemente y las infecciones polimicrobianas. Así mismo, asociado a este tipo de infecciones se evidenciaros aquellos casos con dolor espontaneo o historia de dolor. Del total de bacterias aisladas, un 57.4% correspondieron a anaerobios facultativos y un 83,3% a especies Gram-positivas. El género más frecuentemente aislado fue *Enterococcus spp*, seguido de *Streptococcus spp.* y *Actinomyces spp* (52).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como endodoncistas empleamos varias técnicas de obturación como fase final del tratamiento endodóntico. Es bien conocido que la filtración bacteriana se da a través de cualquier técnica o material de obturación, al igual que se conoce que el *Enterococcus faecalis* es una de las bacterias que más se encuentra en retratamientos; por lo que surgen los siguientes cuestionamientos:

¿Cuánto tiempo tarda *Enterococcus faecalis* en filtrar a través de tres diferentes técnicas de obturación?

¿Cuál técnica endodóntica de obturación será más resistente a la filtración por *Enterococcus faecalis*?

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad *Enterococcus faecalis* representa un problema para el endodoncista, debido a que es una bacteria que a menudo encontramos después de realizar los tratamientos endodónticos. Esta investigación permitirá obtener datos que no se conocen con exactitud.

Los resultados de la investigación permitirán a los estudiantes de la Universidad Autónoma de Sinaloa y a los alumnos del Posgrado de Endodoncia tener dicho conocimiento y con fundamentos emplear la mejor técnica de obturación en cuanto a filtración de esta bacteria. La elección de las técnicas de obturación de condensación lateral, condensación vertical y condensación con guttacondensador, fue por ser las menos complejas, las más económicas y las más reconocidas lo que permitirá que todo especialista tenga conocimiento y buena práctica respecto a ellas.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar cuál es la mejor técnica de obturación endodóntica en cuanto a filtración de *Enterococcus faecalis*.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obturar los órganos dentales con tres diferentes técnicas de obturación: técnica de condensación lateral, técnica de condensación con guttacondensor y técnica vertical.
- Cuantificar el tiempo de filtración de *E.faecalis* a través de los órganos dentales obturados, con las diferentes técnicas de obturación.
- Determinar la presencia de *E.faecalis* en los dispositivos filtrados.
- Comparar las diferentes técnicas de obturación y los tiempos de filtración de *E. faecalis*

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Estudio experimental *in vitro*, de corte longitudinal, de tipo prospectivo.

6.2. MUESTRA DE ESTUDIO

La muestra fue no probabilística. Se utilizaron órganos dentales (OD) unirradiculares, extraídos en la clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de Guasave, Sinaloa. El tamaño final de la muestra fue de 54 órganos dentales

6.2.1. Criterios de inclusión

Se emplearon los criterios de inclusión tales como: órganos dentales que sean unirradiculares, sin caries dental que afecte la raíz del órgano dental, ausencia de fracturas o fisuras visibles, ápices completamente desarrollados y ausencia de calcificaciones.

6.2.2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron: órganos dentales bi o tri radiculares, caries radicular, presencia de fracturas o fisuras visibles y presencia de calcificaciones, órganos dentales ya tratados endodónticamente y dientes con perforaciones radiculares.

6.2.3. Criterios de eliminación

Los criterios de eliminación que se tomaron en cuenta fueron: órganos dentales que se fisuraran, fracturaran o que fueran perforados durante el procedimiento.

6.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Descripción	Tipo	Indicador
Filtración	Proceso de separación de sólidos en suspensión en un líquido mediante un medio poroso, que retiene los sólidos y permite el paso de los líquidos.	Cualitativa	Presencia o ausencia de turbidez.

6.4. LUGAR DE REALIZACIÓN

Este trabajo se realizó en el edificio de la Facultad de Odontología en la Unidad de Posgrado, Especialidad en Endodoncia en colaboración con la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

6.5. PROCEDIMIENTO

6.5.1. Almacenamiento

Los órganos dentales se almacenaron desde el momento de la extracción, hasta su preparación en agua de uso a temperatura ambiente. Los cálculos o tejidos blandos en las raíces fueron removidos con hojas de bisturí, con cuidado de no dañar la superficie de la raíz.

6.5.2. Preparación de las piezas dentarias

Antes del experimento, se lavaron los dientes en agua de uso por un lapso de dos horas. Las coronas de todos los especímenes se seccionaron a nivel cervical, retirando la parte coronal para facilitar su instrumentación con una sierra de diamante rotativa. (Accutom Struer Copenhagen Dinamarca).

Los órganos dentales, se estandarizaron a una medida de 14 mm de la parte coronal al ápice de cada órgano dental, se instrumentaron con una técnica manual de manera inicial utilizando limas tipo K (Denstply Maillefer, Ballaigues, Suiza), posteriormente se instrumentó con el sistema rotatorio Endosequence #25, #30, #35 y #40, y como irrigantes se usó hipoclorito de sodio al 5.25%, para retirar desechos orgánicos, seguido de agua destilada y posterior solución EDTA 17% (Smear Clear), durante 5 minutos (min.) para retirar los restos de dentina (material inorgánico), se lavaron de nuevo con hipocloritos de sodio para dejar los túbulos dentinarios completamente limpios y se lavó con agua bidestilada por 3 minutos para eliminar los restos de estas soluciones. Los conductos radiculares se secaron con puntas de papel estéril (Denstply Maillefer esterilizadas en autoclave durante 20 min. A 121 ° C). Los órganos dentales se esterilizaron de igual manera y posteriormente se obturaron.

6.5.3. Grupos de estudio

GRUPO 1: fueron obturados 18 dientes con la técnica de condensación lateral, 15 de muestra, 1 para control de contaminación y dos como controles de filtración.

GRUPO 2: fueron obturados 18 dientes con la técnica de condensación vertical, 15 de muestra, 1 para control de contaminación y dos como controles de filtración.

GRUPO 3: fueron obturados 18 dientes con la técnica de condensación termoplastificada con guttacondensador, 15 de muestra, 1 para control de contaminación y dos como controles de filtración.

6.5.4. Técnicas de Obturación

6.5.4.1. Técnica de condensación lateral

Se colocó un cono principal estandarizado #40 en el interior del conducto hasta la longitud de trabajo previamente pasado por el cemento sellador Óxido de Zinc y Eugenol (ZOE), se colocó un espaciador B 30 1 mm antes de la longitud de trabajo y se giró de izquierda a derecha sin presión para abrir espacio y se colocó una punta accesoria de gutapercha médium fine (Mf) previamente pasada por el cemento , y se repitió el proceso hasta que el espaciador no logro entrar, después con un recortador de gutapercha Glick previamente calentado se recortó el penacho formado por todas las puntas de gutapercha justo en el límite de la sección del OD.

6.5.4.2. Técnica de condensación vertical

Se colocó un cono principal estandarizado #40 previamente pasado sobre el cemento ZOE a 1 mm de la longitud de trabajo y se recortó con un transportador de calor (Transportadores de Schilder) previamente pasado por el fuego a 3 mm antes de la longitud de trabajo, al recortarlo se colocó en el interior el otro lado obturador del instrumento y se condensó con una ligera presión el material que quedaba en el interior del conducto, para rellenar el resto del conducto puntas accesorias Mf fueron recortadas en trozos de 2 mm y tomados una a una con el transportador de calor pasado ligeramente cerca de la llama de un mechero e introducidos en el conducto y con la parte obturadora y ligera presión se introdujo

el material lo más apicalmente posible, de esta manera se repitió el proceso hasta que el conducto quedo completamente obturado.

6.5.4.3. Técnica de condensación con guttacondensador

Se colocó en el interior del conducto un cono estandarizado #40 previamente pasado por el cemento hasta la longitud de trabajo requerida, se introdujo un espaciador B 30 a 1 mm de la longitud de trabajo y se introdujo una punta accesoria Mf, esto se repitió una vez más dejando dos puntas accesorias únicamente y se introdujo en el interior del conducto a 5 mm de la longitud de trabajo un guttacondensador 40 activado con un motor a 1,500 rpm se mantuvo en el interior con ligera presión hasta que por la misma producción de calor el material de obturación fue generando su expulsión y dejando termoplastificado en el interior del conducto las puntas previamente colocadas.

6.5.5. Ensamblado del dispositivo de filtración

Se realizó la fabricación del dispositivo de filtración bacteriana. Se colocó un mechero de Bunsen, para que la flama mantuviera un área libre de gérmenes para la fabricación de este, se utilizó un tubo Falcón de 15 ml que fue destapado y colocado al igual que la tapa bajo luz ultravioleta durante 10 min. Para una mayor esterilización, al cual se le recortó de 5 a 10 mm de su parte inferior, dependiendo el tamaño y el grosor del diente previamente obturado a colocar en el tubo. Se

colocó el diente y se aseguró con acrílico rosa (monómero y polímero Nic-Tone), y se selló con cera rosa caliente. Se colocó por 10 min bajo luz ultravioleta y el tubo falcón se colocó en el interior de un recipiente de vidrio que contenía 5 ml de Tripticasa de Soya (TSB) mas eritromicina 0.25 µg/ ml, previamente esterilizados, se selló con cera rosa caliente permitiendo que el ápice del órgano dental tocara el medio de cultivo, posterior a esto se colocaron 5 ml TSB en el interior del tubo Falcón, y se revisó la inexistencia de posibles fugas 48 hrs. después.

6.5.6. Ensayos de filtración

A los dos días de armados los dispositivos verificando que no hubiese ningún tipo de filtración en ellos se procedió a la inoculación de la bacteria, se retiró el medio de cultivo y se colocaron 4 ml de TSB y 1 ml de TSB mas *E. faecalis* estandarizado al 0.5 del Nefelómetro de Macfarland (anexo 1). Una vez realizada la inoculación los dispositivos se colocaron en una incubadora a 37°C, y se realizaron cambios de cultivo cada dos días para mantener la viabilidad de los microorganismos hasta que estos lograron pasar a través del material de obturación, los dispositivos fueron revisados diariamente para determinar el tiempo de filtración.

6.5.6.1. Controles

Los dispositivos para control de contaminación fueron armados de la misma manera que para las pruebas sin la inoculación de la bacteria. Los dispositivos para control de filtración #1 contenían en la parte inferior 5 ml de agua destilada estéril y en la parte superior 5 ml de agua destilada con colorante (cristal violeta); y los dispositivos de filtración #2 no contenía líquido en la parte inferior y en la superior contenía 5 ml de agua destilada con colorante. A estos controles no se requirió hacerles ningún cambio de líquidos.

6.5.7. Diagnóstico molecular

Una vez filtrados todos los dispositivos de los tres grupos se tomaron muestras de 500 µl de la parte superior y la parte inferior de cada uno de los dispositivos para la identificación de la bacteria *Enterococcus faecalis* mediante técnicas moleculares, amplificando el gen de la proteína Verde Fluorescente (GFP) contenida en el genoma de la bacteria utilizada en el ensayo, misma característica que le proporciona la resistencia al antibiótico eritromicina.

6.5.7.1. Extracción de ADN genómico bacteriano

A partir de las muestras obtenidas de los dispositivos se realizó la extracción siguiendo la metodología de Sambrook (53), brevemente: 500 µL de bacteria en caldo se colocaron en un tubo eppendorf, se centrifugo a 5,000 rpm por 5 min, se

lavó con solución salina (SS) estéril. Se volvió a centrifugar a 5,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de Buffer TE. Se calentó a 95 °C por 5 min e inmediatamente se enfrió por 2 min se repitieron 2 veces más los pasos de calentamiento y enfriamiento y se centrifugo a 13,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante.

6.5.7.2. Identificación de *E. faecalis*.

La PCR para la amplificación del ADN obtenido anteriormente se realizó según la metodología citada por Scott (54): la amplificación del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se realizó utilizando los iniciadores GFP F y GFP R 0.2 µM, Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, GoTaq Pol 1U (Promega) y 2 µL de ADN, en un volumen final de 50 µL, en el equipo PXE 0.2 (Thermo Electron) bajo las siguientes condiciones 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos (seg.) a 95 °C, 30 seg. a 60 °C y 45 seg. a 72 °C, y un ciclo de 5 min. a 72 °C y 20 min. a 22 °C. Después se hizo una electroforesis en un gel de agarosa 1.5% resuelto a 100 V, por 1 h, para la identificación del ADNg de la bacteria inoculada donde se verifica la presencia de una banda discreta de 665 pb.

6.5.8. Procesamiento estadístico

Los datos se procesaron con un paquete estadístico de IBM SPSS v. 20.0 utilizando las pruebas estadísticas de T Student y ANOVA con corrección de Tukey.

VII. RESULTADOS

Todos los dispositivos filtraron manifestando una turbidez en la parte inferior del mismo (Fig. 1). Los controles se mantuvieron libres de bacterias y sin permitir filtraciones (Fig. 2). Una vez filtrados todos los dispositivos se realizó la amplificación del gen GFP de las extracciones de ADN obtenidas de la parte superior e inferior de cada dispositivo y se realizó electroforesis donde se identificó la bacteria inoculada, confirmando que la *E. faecalis* encontrada era la misma que se inoculó (Fig. 3). Se realizaron pruebas de especificidad haciendo PCR's con ADN de *Streptococo pyogenes*, *Streptococo beta hemolíticos*, *Escherichia coli*, *Enterococo faecalis* aislado clínico, *Sthapylococcus aureus* y un control positivo (*Enterococcus faecalis* GFP), donde se confirmó que únicamente existe la presencia del gen GFP en la bacteria utilizada para el experimento (Fig. 4).

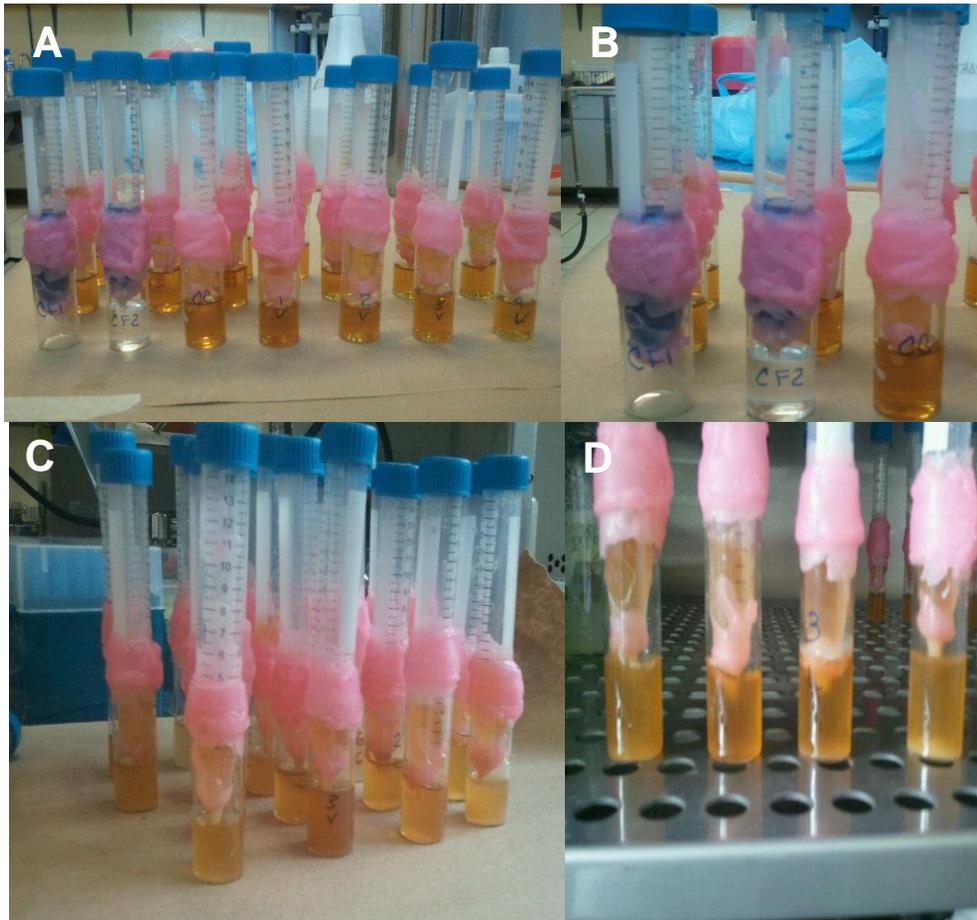


Figura 1. Dispositivos de filtración A) Imagen representativa de los 18 dispositivos armados con la técnica vertical, sin filtrar. B) Dispositivos controles sin mostrar filtración. C) Ejemplo de dispositivos filtrados, donde se aprecia turbidez en la parte inferior. D) Manifestación de turbidez en la parte inferior de los dispositivos.



Figura 2. Electroforesis representativa de la amplificación del gen GFP en controles. Agarosa 1.5%. Carril 1. M marcador 100 pb (Promega); Carril 2. Blanco, muestra amplificación del gen GFP. Carril 3. Control positivo (*Enterococcus faecalis* GFP), muestra banda de amplificación del gen GFP. Carril 4, 5, 6 y 7. Los dispositivos controles; control del caldo superior, control del caldo inferior, control del filtrado superior y control del filtrado inferior respectivamente, no marcaron nada lo que indica ausencia del gen GFP.

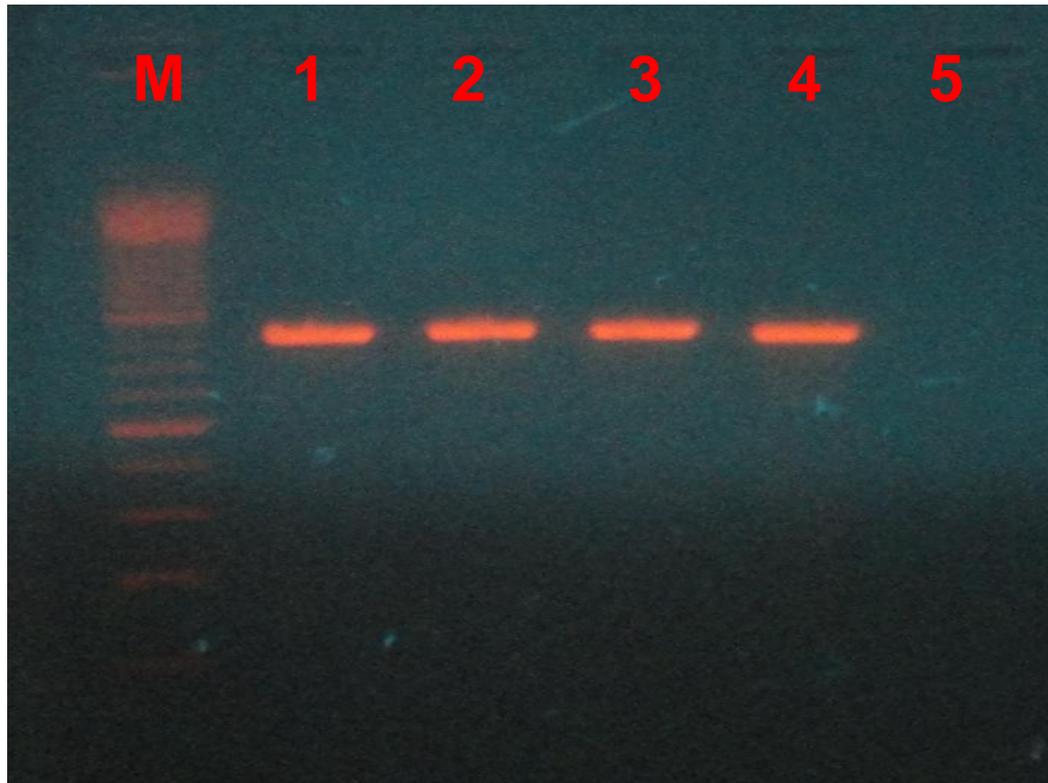


Figura 3. Electroforesis representativa de la amplificación del gen GFP en muestras. Agarosa 1.5%. Carril. 1 marcador 100 pb (promega); Carril 2. Dispositivo núm. 2 de la técnica lateral parte inferior; Carril 3. Dispositivo núm. 2 de la técnica vertical parte inferior; Carril 4. Dispositivo núm. 2 de la técnica con guttacondensor parte inferior; Carril 5. Control positivo (*Enterococcus faecalis* GFP); Carril 6. Blanco de reacción. La presencia de la banda confirma la presencia de la bacteria



Figura 4. Electroforesis representativa de la amplificación del gen GFP muestras y controles de especificidad. Agarosa 1.5%. Carril 1 y 2 Dispositivo número 15 de la técnica vertical parte inferior y superior respectivamente. Carril 3, 4, 5, 6 y 7. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus beta hemolíticos*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* aislado clínico, *Staphylococcus aureus*. Carril 8. Control positivo de *E. faecalis GFP*. Carril 9. Marcador de 100 pb (promega).

En cuanto a los días de filtración, cada técnica tuvo variaciones, de los 15 dispositivos utilizados en la técnica lateral (grupo 1): 5 filtraron al sexto día mientras que 10 hasta el séptimo día, con un promedio de filtración de 6.7 ± 0.5 días. Dentro de los dispositivos que fueron obturados con la técnica de condensación vertical (grupo 2) : 2 filtraron al noveno día mientras que 13 en el octavo día con un promedio de filtración de 8.1 ± 0.4 días. Los dispositivos donde los órganos dentales fueron obturados con la técnica con guttacondensador (grupo 3): 14 tuvieron filtración al octavo día y uno al noveno con un promedio de filtración de 8.1 ± 0.3 días. Lo que bajo el procesamiento de la prueba estadística T de Student muestra una diferencia significativa con valor de $p < 0.001$ entre grupo 1 y los grupos 2 y 3. (Fig. 5). Los resultados se corroboraron utilizando la prueba de ANOVA con corrección de Tukey, donde también se reveló una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$ entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3.

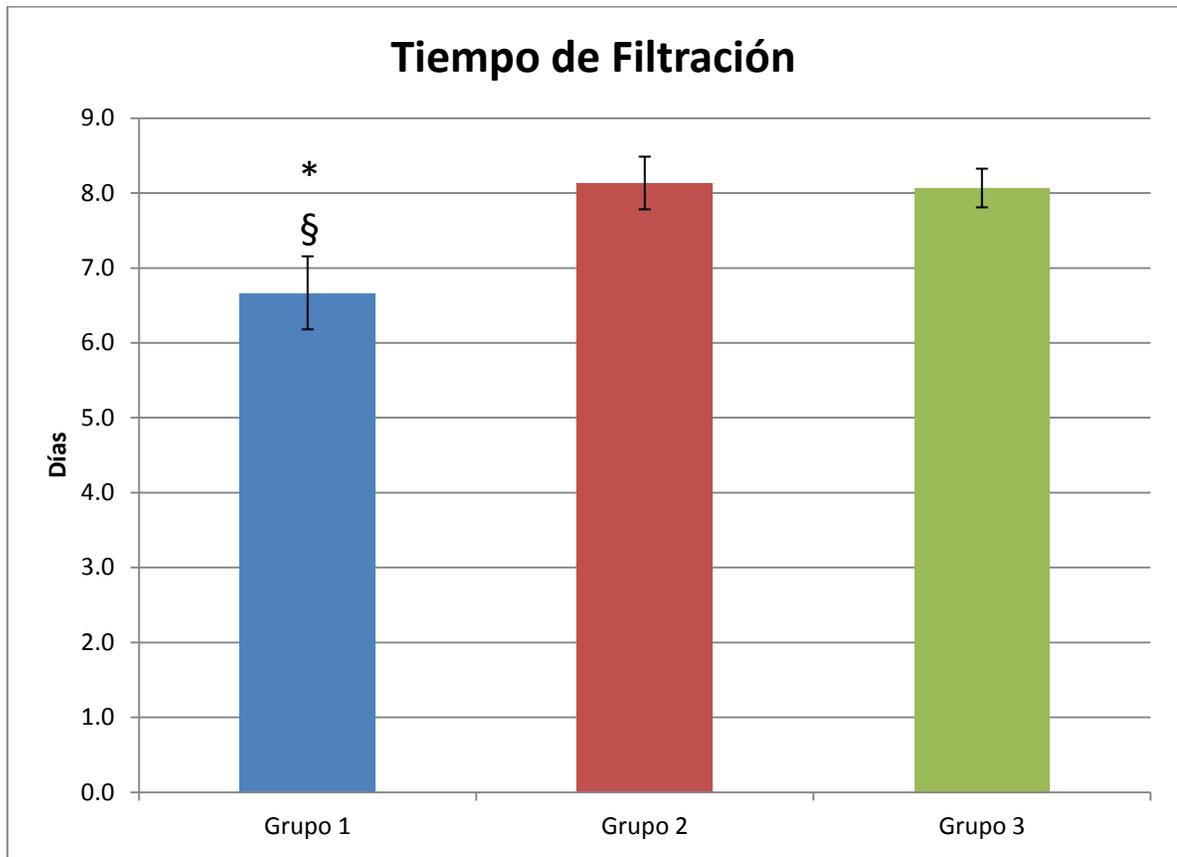


Figura 5. Grafica de los días de filtración de cada una de las técnicas. Grupo 1: Técnica lateral; Grupo 2: Técnica vertical; Grupo 3: Técnica con guttacondensador * Diferencia significativa $p < 0.001$ entre grupo 1 y 2 § Diferencia significativa $p < 0.001$ entre grupo 1 y 3.

VIII. DISCUSIÓN

Torabinajed demostró que cuando los conductos obturados son desafiados por bacterias, el 100% permite la penetración a través de toda la longitud del canal dentro de 30 días, con lo que este estudio está de acuerdo ya que todas las muestras obturadas con diferentes técnicas tuvieron su periodo de filtración dentro de los 6 a los 9 días a través de todo el material (5). A diferencia de los resultados obtenidos en un estudio realizado por Wedding quien comparó la filtración de dos materiales de obturación, resilon y gutapercha, y demostró que la microfiltración en la gutapercha se inicia desde el día 1 pero vence la resistencia del material hasta el día 13 con quien según nuestros resultados no coincidimos (12). La diferencia tan marcada tal vez pueda deberse a que la bacteria *Enterococcus faecalis* con que estos investigadores trabajaron fue clínica y en nuestra investigación estamos convencidos que es una bacteria altamente patógena adicionada a la introducción del gen GFP y la resistencia a eritromicina.

Un estudio realizado por Baumgartner para determinar la filtración del *Enterococcus faecalis* a través de diferentes materiales de obturación, la gutapercha y el resilon. Utilizaron al igual que en esta investigación órganos dentales unirradiculares y un dispositivo a prueba de fugas que también indicaba turbidez con el paso de la bacteria. En los resultados obtuvieron que el tiempo medio estimado para que se produzca la turbidez o indicación de filtración en la obturación con gutapercha fue de 35 días, resultado que no coincide con los obtenidos en este trabajo de investigación (25). Esta diferencia pudo deberse a

que Baumgartner realizó la inoculación de la bacteria en el dispositivo y no realizaba recambios de medio, lo que pudo ayudar a que se retrase el paso de la bacteria, por estar en condiciones en las que no estaría en boca (sin nutrientes).

En un estudio realizado por Page donde evaluó la filtración de la técnica de obturación lateral y técnicas térmicas de condensación confirmó que la técnica lateral es la que recibe las primeras filtraciones totales en comparación con las técnicas térmicas, al igual que en esta investigación, ya que *Enterococcus faecalis* demostró las primeras filtraciones en los dispositivos obturados con la técnica lateral en el sexto y séptimo día mientras que los dispositivos que fueron obturados con la técnica vertical y la técnica con guttacondensador, donde existe la aplicación de calentamiento, la bacteria mostró indicios de filtración en el octavo y noveno día (52). Brothman citado por Karr menciona que los resultados indican un mejor sellado hermético cuando la obturación implica un calentamiento de la gutapercha (55).

Shipper realizó un estudio en el que comparó la fuga microbiana de nuevas técnicas de obturación; utilizando una cámara de división microbiana modelo a prueba de fugas inoculando *Streptococcus mutans* en la cámara superior donde solo podría llegar a la parte inferior a través del conducto obturado al igual que nuestro dispositivo, con el que esta investigación concide que es la mejor manera de realizar este tipo de estudio. Las fugas se evaluaron durante 30 días se utilizaron 140 dientes unirradiculares humanos, divididos en partes iguales entre la técnica lateral y vertical y obtura II y el porcentaje de especímenes que filtro a los 30 días con condensación lateral y condensación vertical de gutapercha con

sellador AH26 fue de 87% y 73% respectivamente. Este estudio únicamente coincide en que efectivamente la técnica de condensación lateral permite una mayor filtración y los días de filtración, en base a los resultados, se muestran algo excesivos (5).

Wong citado por Gound informaron que las obturaciones con condensación vertical fue 2.8 % más pesadas que las obturaciones con la técnica lateral y la segunda tenía mayor colorante. (3, 56, 57) en base a esto pudiésemos pensar que los microorganismos que filtran a través de todo el conducto obturado obtienen una gran ventaja en tiempo de filtración dependiendo de los espacios vacíos presentes. En este estudio la aplicación de colorantes solo se utilizó en los dispositivos que sirvieron para controles de filtración, ya que la filtración de estos solo demuestra una deficiencia notoria en la obturación o un error en el armado del dispositivo, como lo podemos comprobar ninguno de los controles de filtración permitió el paso de fluidos lo que es uno de los propósitos de la obturación, únicamente se dio el paso de la bacteria ya que este representa un proceso biológico de la misma.

Bowman menciona que una de las posibles deficiencias de la compactación lateral es la replicación relativamente pobre de las paredes del conducto y la tendencia a formar espacios vacíos y las vías del espaciador entre las puntas de la gutapercha, lo que permite que sea mayormente filtrable en comparación con cualquier otra técnica de obturación, y efectivamente cuando comparamos las tres técnicas de obturación, en la que la bacteria logra filtrar más rápido es la técnica lateral (15).

Jacobson realizó un estudio donde evaluó la fuga microbiana de tres sistemas de obturación Obtura III, System B y con técnica de condensación lateral. Sesenta OD fueron evaluados en ese estudio. Un modelo de filtración bacteriana anaeróbica se utilizó y los resultados indicaron que la filtración coronal microbiana se produce más rápidamente mediante condensación lateral que con la onda continúa System B y Obtura III. Lo que al igual que estos resultados indica que hay menor filtración en técnicas de condensación donde es aplicado algún sistema de calor (58).

IX. CONCLUSIONES

En este estudio se reveló una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre la técnica de condensación lateral y las técnicas de condensación vertical y con guttacondensador. Lo que indica que las técnicas vertical y con guttacondensador retrasan más la filtración bacteriana.

Además de confirmarse la eficacia del dispositivo a prueba de fugas como material para la evaluación de filtración bacteriana.

Se comprueba que la prueba diagnóstica de PCR del gen GFP resulta eficaz en la identificación bacteriana.

X. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos de este estudio podemos observar que todas las obturaciones son filtrables independientemente de la técnica de condensación utilizada, por eso es importante que como especialistas dediquemos el tiempo suficiente para explicar al paciente y al rehabilitador la importancia que tiene el colocar una restauración final para el éxito del tratamiento.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Soares J., Goldberg F. *Endodoncia Técnica y Fundamentos*. Edit. Medica Panamericana. Argentina. 2002. Pp. 141-165.
2. Cohen S., Burns R. *Vías de la pulpa*. Ed. 8. Edit. EDIDE. S. I. España. 2004. Pp 245-278.
3. Gound T., Riehm R., Odgaard E. Makkawy H. *Effect of Spreader and Accesory cone size on density of obturation using conventional or mechanical lateral condensation*. J Endod. Vol. 27. No. 5. Mayo. 2001.
4. Vázquez E., Mondragón JD. *Endodoncia*. Edit. Talleres de Royal Litographics. México. 2002. Pp. 237-252.
5. Shipper G. Trope M. *In vitro microbial leakage of endodontically treated teeth using new and standard obturation techniques*. J Endod. Vol. 30. No. 3. March. 2004.
6. Jacobson J., Xia T., Baumgartner CJ., Marshall J., Beeler W. *Microbial leakage evaluation of the continuous wave of condensation*. J Endod. Vol. 28. No. 4. April. 2002.
7. Su Y., Wang C. Ye L. *Healing rate and post-obturation pain of single- versus multiple visit endodontic treatment for infected root canals: a systematic Review*. J Endod. Vol. 37. Number 2. Febrero. 2011.
8. Saleh M., Ruyter I., Hapasalo M. *Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro*. Int Endod J. Vol. 37. 2004. Pp. 193-198.

9. Smith R., Weller N., Loushine R.J., Kimbrough WF. *Effect of Varying the depth of heat application on the adaptability of Gutta- Percha during warm vertical Compaction.* J Endod. Vol. 26. No. 11. November. 2000.
10. Karr NA., Baumgartner C., Marshall JM. *A comparison of Gutta- percha and resilon in the obturation of lateral grooves and depressions.* J Endod. Vol. 33. No. 6. June. 2007.
11. Sagsen B., Ozgur E., Kahraman.,OrucogluH.*Evaluation of microleajage of roots filled with different technioques with computerized fluid filtration technique.* J Endod. Vol. 32. No.12. December. 2006.
12. Wedding J., Brown C., Legan J., Moore B., Vail M. *An in vitro comparison of microleakage between resilon and Gutta-percha with a fluid filtration model.* J Endod. Vol. 33. No. 12. December. 2007.
13. Aguilar T., *Aspectos Microbiologicos de la Periodontitis Apical Cronica Persistente.* Revista CES de Odontología. Vol. 6. Pp 120-145.
14. Gound T., Riehm R., Makkawy H., Odgaard E. *A description on alternative method of lateral condensation and comparison of the ability to obturate canals using mechanical or traditional lateral condensation.* J Endod. Vol. 26. No. 12. December. 2000.
15. Bowman C., Baumgartner CJ. *Gutta- perchas obturation of lateral groves and depressions.* J Endod. Vol. 28. No. 3. March. 2002.
16. Dagher F., Yared G. *Influence of operator proficiency on the sealing ability of the vertical condensation.* J Endod. Vol. 21. No. 6. June. 1995.
17. Bowman C., Baumgartner CJ. *Gutta- perchas obturation of lateral groves and depressions.* J Endod. Vol. 28. No. 3. March. 2002.

18. Lea C., Apicela M., Mine SP., Yancich P., Parker MH. *Comparison of obturation density of cold lateral compaction versus warm vertical compaction using the continuous wave of condensation technique.* J Endod. Vol. 31. No.1. January. 2006.
19. Collins J., Walker M., Kulild J., Lee C. *A comparison of three Gutta- percha obturation techniques to replicate canal irregularities.* J Endod. Vol. 32. No. 8. August. 2006.
20. Chu F., Leung K., Tsang P., Chow T., Samaranayake L. *Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two- visit endodontic treatment with antibiotics/Steroid or calcium Hydroxide dressing.* J Endod. Vol. 32. No. 1. January. 2006.
21. Ebert J., Roggendorf MJ., Frank K., Petschelt A. *Antimicrobial activity of various 'active' gutta-percha points against Enterococcus faecalis in simulated root canals.* Int Endod J. 2008; 41(3):249-57 (ISSN: 0143-2885)
22. Siqueira J. *Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections.* J Endod. Vol29. No. 10. October. 2003.
23. Pommel L., Camps J. *Effecte of pressure and measurement time on the fluid filtration method in endodontics.* J Endod. Vol. 27. No. 4. April. 2001.
24. D'Ercole S., Filippakos A., Leonardo R., Pameijer CH., Tripodi D. *.Enterococcus faecalis leakage of root canal sealers: an ex vivo study.*J.Biol Regul Homeost Agents. 2012; 26(3):545-52 (ISSN: 0393-974X).
25. Gandolfi M., Salvatore S., Monocci F., Watson T., Zanna S., Capoferri M., Patri C. *New tetrasilicate cements as retrograde filling material: an in vitro study on fluid penetration.* J Endod. Vol. 33. No. 6. June. 2007.

26. Siqueira J. *Exploiting molecular methods to explore endodontics infections: part 2. Redefining the endodontic microbiota.* J Endod. Vol. 31. No. 7. July. 2005.
27. Siqueira J., Rocas I. *Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures.* J Endod. Vol. 34. No. 11. November. 2008.
28. Farber P., Seltzer S. *Endodontic microbiology I etiology.* J Endod. Vol. 14. No. 7. July. 1988.
29. Siqueira J., Rocas I. *Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures.* J Endod. Vol. 34. No. 11. November. 2008.
30. Wang L., Dong M., Zheng J., Song Q., Yin W., Li J; Niu W. *Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment..* J Endod. 2011; 37(5):631-6 (ISSN: 1878-3554)
31. Morgental R., Tanomaru JM., Faria NB., Duarte MA., Kuga MC., Filho M. *Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with Enterococcus faecalis.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112(3):396-400 (ISSN: 1528-395X)
32. Baumgartner G., Zehnder M., Paque F. *Enterococcus Faecalis Type strain leakage through root canal filled with Gutta-percha / AH Plus or resilon/ Epiphany.* J Endod. Vol. 33. No. 1. January. 2007.

33. Guo HJ., Yue L. *Patterns of Enterococcus faecalis in infected root canals: an in vitro study*. Beijing Da XueXueBao. 2009; 41(6):699-701 (ISSN: 1671-167X)
34. Rocas I., Siqueira J., Santos K. *Asosiation of ofEnterococcusfeacalis with diferent forms of periradiculars diseases*. J Endod. Vol. 30. No. 5. May. 2004
35. Gorduysus M., Nagas E., Torun OY.,Gorduysus O. *A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal*. Aust Endod J. 2011; 37(3):128-33 (ISSN: 1747-4477)
36. Harrison AJ., Chivatxaranukul P., Parashos P., Messer HH. *The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of Enterococcus faecalis in experimentally infected root canals*. Int Endod J. 2010; 43(11):968-77 (ISSN: 1365-2591).
37. Saleh IM., Ruyter IE., Haapasalo M., Ørstavik D. *Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro*. Int Endod J. 2004; 37(3):193-8 (ISSN: 0143-2885)
38. Noetzel J; Nonhoff J; Bitter K; Wagner J; Neumann K; Kielbassa AM. *Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against Enterococcus faecalis in root canals*. Am J Dent. 2009; 22(1):14-8 (ISSN: 0894-8275)
39. Siqueira J. Santos K. *Identification of Enterococcusfeacalis in root-filled teeth with periradicular lesions*. J Endod. Vol. 33. No. 9. August. 2009.
40. Rathnayake I.,Hargreaves M.,Huygens F. *SNP diversity of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in a South East Queensland waterway*,

- Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. BMC Microbiol. 2011; 11:201 (ISSN: 1471-2180)*
41. Hayakawa K., Marchaim D., Martin ET., Tiwari N., Yousuf A., Sunkara B. *Comparison of the clinical characteristics and outcomes associated with vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant E. faecium bacteremia. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(5):2452-8 (ISSN: 1098-6596)*
 42. Fedele R., Roberts A.A *preliminary study investigating the survival of tetracycline resistant Enterococcus faecalis after root canal irrigation with high concentrations of tetracycline. Int Endod J. 2007; 40(10):772-7 (ISSN: 0143-2885)*
 43. Siqueira J., Rocas I. *Nested PCR detection of centipede periodontii in primary endodontic infections. J Endod. Vol. 30. No. 3. March. 2004.*
 44. Peciuliene V., Balciuniene I., Eriksen H., Hapasalo M. *Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled Canals in a Lithuanian population. J Endod. Vol. 26. No. 10. October. 2000.*
 45. Gorduysus M., Nagas E., Torun OY., Gorduysus O. *A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal. Aust Endod J. 2011; 37(3):128-33 (ISSN: 1747-4477)*
 46. Sedgley CM. *The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of Enterococcus faecalis with and without gelatinase production ability in obturated root canals. J Endod. 2007; 33(5):561-6 (ISSN: 0099-2399)*

47. Sedgley CM., Lennan SL., Appelbe OK. *Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo*. Int Endod J. 2005; 38(10):735-42 (ISSN: 0143-2885)
48. Siqueira J., Rocas I. *Nested PCR detection of centipede periodontii in primary endodontic infections*. J Endod. Vol. 30. No. 3. March. 2004.
49. 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. Vol. 32. No. 8. August. 2006.
50. Zoletti G., Siqueira J., Santos K. *identification of Enterococcus faecalis in root filled teeth with or without periradicular lesions by culture- dependent and independent approaches*. J Endod. Vol. 32. No. 8 . August. 2006.
51. Sedgley C., Nagel A., Dahlen G., Reit A., Molander A. *Real time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root Canals*. J Endod. Vol. 32. No. 3. March. 2006.
52. Wang L., Dong M., Zheng J., Song O., Yin W., Li J., Niu W. *relationship of biofilme formation and gene expression in recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment*. J Endod. Vol. 37. No. 5. May. 2011.
53. Sambrook J., Russell DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
54. Scott, K. P., Mercer, D. K., Richardson, A. J., Melville, C. M., Glover, L. A., & Flint, H. J. (2000). *Chromosomal integration of the green fluorescent protein gene in lactic acid bacteria and the survival of marked strains in human gut simulations*. FEMS Microbiol Lett, 182(1), 23-27.

55. Page M., Hargreaves K., Eldeeb M. *Comparison of concentric condensation technique with laterally condensed Gutta-percha*. J Endod. Vol. 21. No. 6. June. 1995
56. Ponce A., Izquierdo JC., Reyer JC. *Estudio comparativo de filtración apical de compactación lateral en frío y obturación con System B*. Revista Odontológica Mexicana. Vol. 9. 2005. Pp 65-72.
57. Epley S., Fleischman J., Hartwell G., Cicalese C. *Completeness of root canal obturations: Epiphany techniques versus Gutta-Percha techniques*. J Endod. Vol. 32. No. 6. June. 2006.
58. Saenz CC., Guerrero. *Estudio comparativo de micro filtración apical de sistemas de obturación endodoncia*. Revista Odontológica Mexicana. Vol. 13. 2009. Pp. 136-140.

ANEXOS

1. Turbidez estándar

1.1. Preparación de la turbidez estándar de McFarland

La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland preparada comercialmente está disponible de varios fabricantes. Además, la turbidez estándar de 0,5 de McFarland puede prepararse añadiendo 0,5 ml de una solución de cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1,175% (p/vol) a 99,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (vol/vol). La turbidez estándar se divide en alícuotas, se coloca en tubos de prueba idénticos a aquellos utilizados para preparar la suspensión del inóculo. Selle los tubos de turbidez estándar de McFarland con cera, Parafilm u otros medios para prevenir la evaporación. La turbidez estándar de McFarland se puede guardar hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente ($22^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$); descártela después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Marque el tubo para indicar el nivel del líquido y verifique antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, debe prepararse una turbidez estándar fresca) Antes de utilizarlos, agite bien el tubo que contiene la turbidez estándar, de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

La composición de la turbidez estándar de McFarland y las correspondientes densidades de bacterias (/ml) se presentan en la Cuadro 1.

La exactitud de la densidad de la turbidez estándar de McFarland preparada se debe comprobar mediante un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm; para

la turbidez estándar de 0,5 de McFarland, la absorbancia de una longitud de onda de 625 nm debe ser de 0,08–0,1. De otro modo, la exactitud de la turbidez estándar de McFarland puede verificarse por ajuste de una suspensión de una cepa de control (por ejemplo, E. coli ATCC 25922) a la misma turbidez, preparando diluciones seriadas 10 veces, y desarrollando después conteos de colonias en placa (véase la Figura 6). La suspensión ajustada debe dar un conteo de 10^8 unidades formadoras de colonia/ml. Las Figuras 7 y 8 sirven de guía para leer y comparar la turbidez estándar de McFarland con una nueva preparación de suspensión celular.

1.2. Método de conteo en placa para probar la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland

El objetivo de este procedimiento es determinar el número de bacterias por ml de fluido. Una suspensión bacteriana equivalente en turbidez a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland contiene aproximadamente 10^8 bacterias por ml.

- 1) Prepare una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, como se ha descrito anteriormente.
- 2) Prepare una suspensión de un microorganismo de prueba (por ejemplo, E. coli ATCC 25922) para enfrentar a la densidad de la turbidez estándar de McFarland.
- 3) Haga diluciones seriadas, diluya 10 veces una suspensión bacteriana en un medio de caldo adecuado. (Ejemplos de medios de caldos adecuados incluyen:

caldo de Mueller-Hinton, caldo TS, o BSF.) Los materiales necesarios para las pruebas de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland incluyen: siete tubos estériles de tapa de rosca, siete placas de agar (con medio que permita el crecimiento de los organismos que se están probando) y pipetas capaces de medir, respectivamente, 4,5 ml y 0,5 ml. Además, es útil una máquina vórtex para mezclar vigorosamente en los tubos.

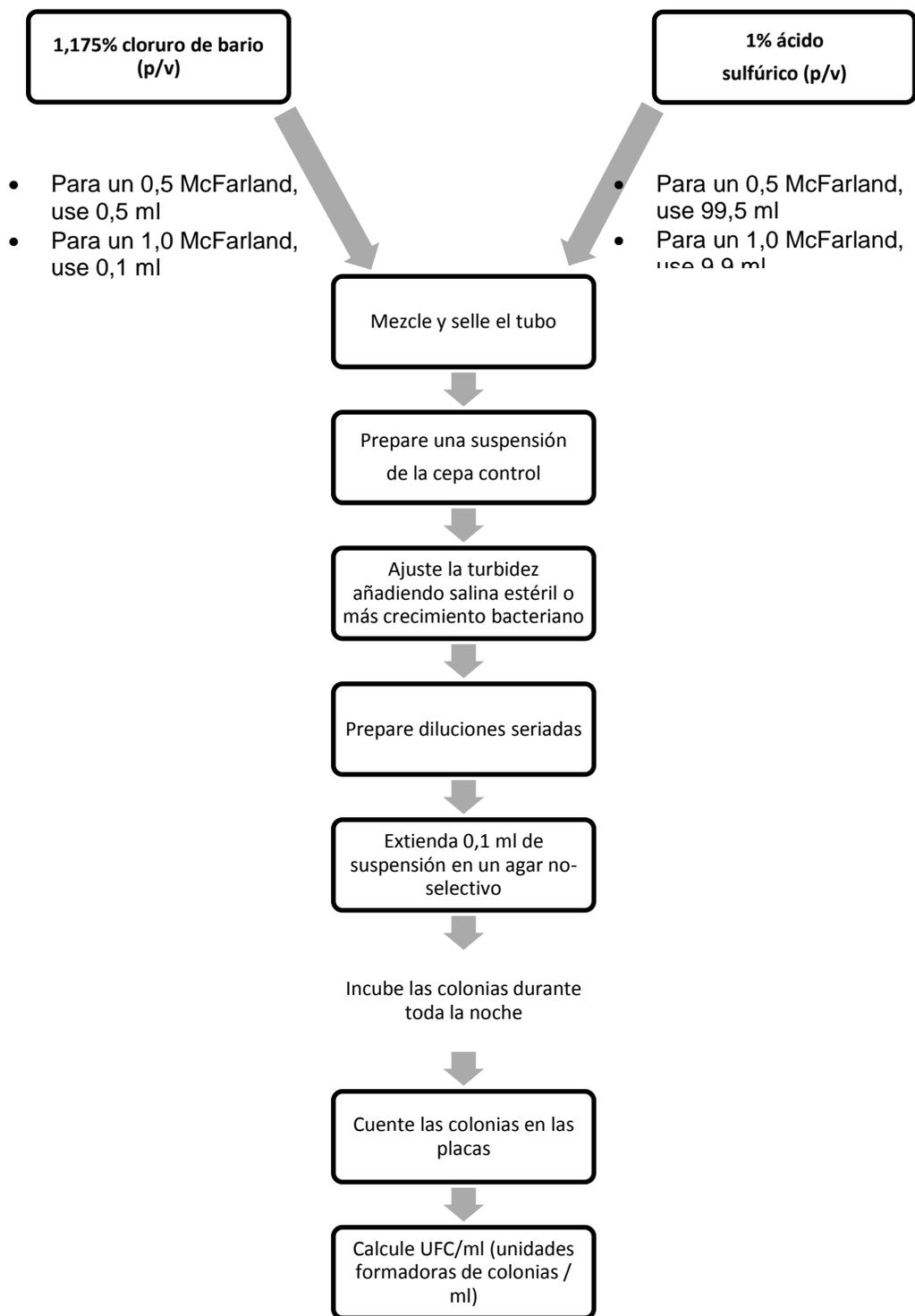


Figura 6. Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland

Cuadro 1. Composición de la turbidez estándar de McFarland

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1,175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Densidad de bacterias aproximada correspondiente
0,5	0,5 ml	99,5 ml	1×10^8
1	0,1 ml	9,9 ml	3×10^8
2	0,2 ml	9,8 ml	6×10^8
3	0,3 ml	9,7 ml	9×10^8
4	0,4 ml	9,6 ml	12×10^8
5	0,5 ml	9,5 ml	15×10^8
6	0,6 ml	9,4 ml	18×10^8
7	0,7 ml	9,3 ml	21×10^8
8	0,8 ml	9,2 ml	24×10^8
9	0,9 ml	9,1 ml	27×10^8
10	1,0 ml	9,0 ml	30×10^8



Figura 7. Comparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland con una suspensión bacteriana

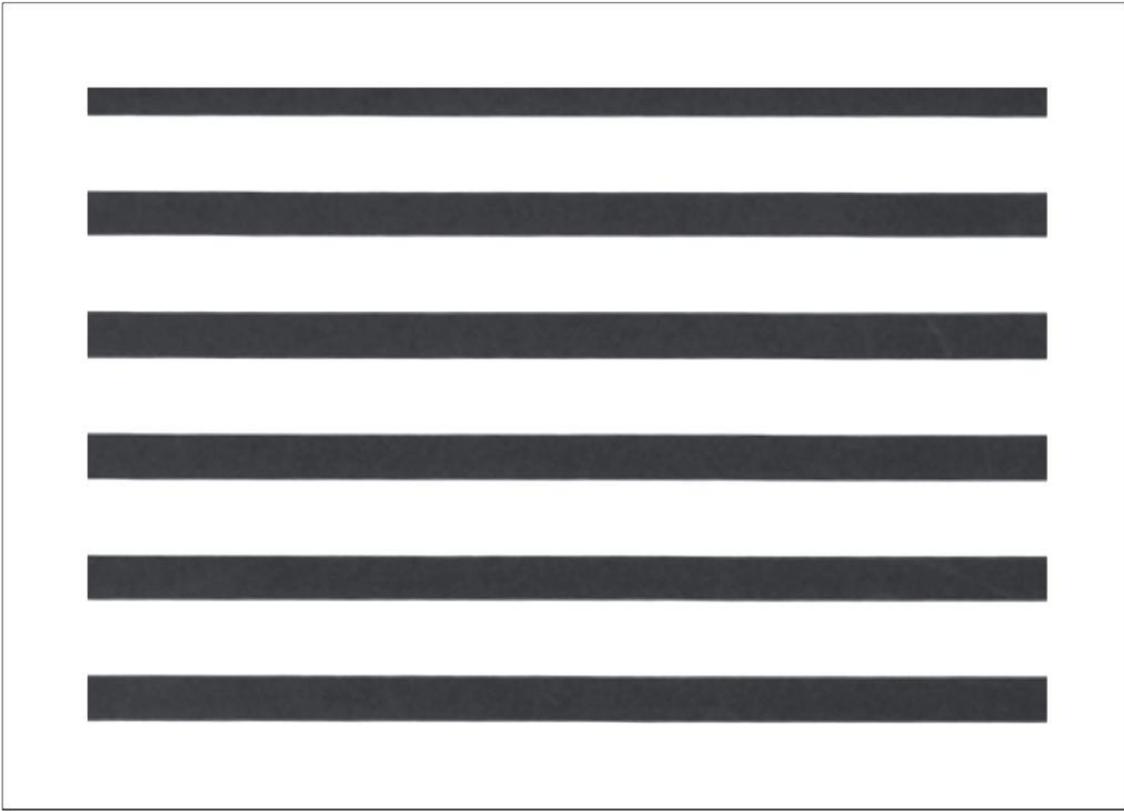


Figura 8. Líneas de fondo para ver la turbidez de una suspensión de inóculo en comparación con la turbidez estándar de McFarland.

1.3. Resultados de la interpretación del conteo por placa

Una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland es equivalente a aproximadamente 10^8 bacterias por ml. La suspensión bacteriana original que se parece a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland podría tener un rango de $1,0 \times 10^8$ bacterias/ml a $9,0 \times 10^8$ bacteria/ml. Dentro de este rango, la turbidez estándar de 0,5 es exacta; la diferencia será evidente por el número de bacterias que crezcan en la placa.

Después que se añadan 0,5 ml de la suspensión bacteriana original (la cual es equivalente a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland) a los 4,5 ml de caldo en el tubo 7 se produce una suspensión de bacterias que contiene aproximadamente 10^7 bacterias por ml. Se transfiere entonces 0,1 ml de esta suspensión a la placa número 7, la cual traduce aproximadamente 10^6 (1.000.000–9.000.000) bacterias presentes en esa placa. Si las bacterias fueron diluidas correctamente: aproximadamente 10^5 (ó 100.000 – 900.000) bacterias deben estar presentes en la placa número 6; aproximadamente 10.000 – 90.000 bacterias en la placa número 5; aproximadamente 1.000 – 9.000 bacterias presentes en la placa número 4; aproximadamente de 100 a 900 bacterias presentes en la placa número 3; aproximadamente de 10 a 90 bacterias en la placa número 2, y aproximadamente de 1 a 9 colonias bacterianas podrían estar presentes en la placa número 1. Cada placa debe tener la décima parte de las bacterias de la placa con el número mayor inmediato superior. Generalmente, la placa marcada con el número 3 será la placa que se cuenta; sin embargo, si hay

más de 300 colonias presentes en la placa número 3, entonces se debe contar la placa número 2.